



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einfluss einer Strahlenbehandlung auf phenolische Inhaltsstoffe in Gewürzen

Verfasser

Tristan Oliver Nagy

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, Juni 2009

Studienkennzahl lt.
Studienblatt:

A 419

Studienrichtung lt.
Studienblatt:

Chemie

Betreuerin / Betreuer:

Univ. Prof. Dr. Gerhard Sontag
Ao. Univ. Prof. Dr. Sonja Solar

Abstract English

The trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) and total phenolic content of the commercially available dried spices oregano, thyme and sage, as well as those of freshly dried oregano, thyme, sage and rosemary were investigated. Changes of these values due to ^{60}Co -gamma irradiation of the dried spice samples were compared with the degradation of the content of their main phenolic components, detectable by HPLC-DAD and LC-MS in methanol-extracts.

The dried spices were purchased from Kottas (Freyung 7, 1010 Vienna) and the freshly dried samples were from own cultivation. Aliquots of each spice sample were irradiated using a ^{60}Co source, Gammacell 220 (NORDION International, Kanada), with 10 kGy. Dry spice samples, both, irradiated and non irradiated references, were extracted (2 g with 50 ml) with methanol/water (80/20, v/v) for three days at room temperature in airtight brown flasks by magnetic stirring. The fresh spice samples were freeze-dried with liquid nitrogen and then air-dried at 105°C for 24 hours before irradiation and then immediately extracted in the same way. The methanolic extracts were stable in the fridge during the whole experimental time, they were used, after suitable dilution, for the evaluation of the total phenolic compound (FC-test), the TEAC values and all HPLC and LC-MS experiments. Both, qualitative and quantitative analyses of phenolic compounds in the spice extracts were performed by RP-HPLC with optical (DAD) and mass spectrometric (ESI-Q-rTOF) detection.

No radiation-induced degradation of total phenolics was observed. The values, however, showed big differences between the commercially available spices and those from own cultivation. Also the TEAC-test results were very similar for both, irradiated and non irradiated samples. The individual phenolic components showed fluctuations in concentration between various extractions of the same sample that were bigger than the expected radiation-induced changes. Therefore no evidence of radiation-induced decay of a particular compound could be observed.

Abstract Deutsch

Die antioxidative Wirksamkeit, angegeben als TEAC-Wert, und der Totalphenolgehalt der kommerziell verfügbaren Trockengewürze Oregano, Thymian und Salbei, sowie frisch getrockneter Gartengewürze (Oregano, Thymian, Salbei und Rosmarin) wurde untersucht. Die Änderung dieser Parameter durch ^{60}Co -Gammabestrahlung der getrockneten Gewürzproben wurde mit dem Abbau ihrer phenolischen Hauptbestandteile, bestimmt durch HPLC-DAD und LC-MS Untersuchungen ihrer methanolischen Extrakte, verglichen.

Die Trockengewürzproben wurden von der Fa. Kottas (Freyung 7, 1010 Wien) bezogen und die getrockneten Frischgewürze kamen aus eigenem Anbau. Je ein Teil jeder Probe wurde in einer ^{60}Co Quelle Gammacell 220 (NORDION International, Kanada) mit 10 kGy bestrahlt. Die Aliquote, bestrahlt und unbestrahlt, wurden danach mit 80%igem wässrigen Methanol für drei Tage bei Raumtemperatur extrahiert. Die Frischgewürzproben wurden vor der Bestrahlung mit flüssigem Stickstoff gefriergetrocknet und dann im Trockenschrank bei 105°C wasserfrei getrocknet. Die Methanolextrakte waren im Kühlschrank über den gesamten Messzeitraum stabil, sie wurden in geeigneter Verdünnung zur Bestimmung des Totalphenolgehaltes (FC-Test), der antioxidativen Wirksamkeit (TEAC-Wert) und für die HPLC sowie LC-MS Untersuchungen verwendet. Die qualitative und quantitative Analyse der phenolischen Inhaltsstoffe erfolgte durch reversed phase Chromatographie (RP-HPLC) mit optischer (DAD) und massenspektrometrischer (ESI-Q-rTOF) Detektion.

Beim Gesamtphenolgehalt der Proben konnte kein Bestrahlungseinfluss festgestellt werden, er war aber sehr unterschiedlich für die Gewürzproben unterschiedlicher regionaler Herkunft. Auch die TEAC-Werte bestrahlter und unbestrahlter Proben unterschieden sich kaum.

Die phenolischen Inhaltsstoffe zeigten bei mehrmaliger Extraktion derselben Gewürzprobe Konzentrationsschwankungen, die größer waren als der zu erwartende Bestrahlungseinfluss. Es konnte daher keine Aussage über einen durch Strahlung bedingten Abbau einer einzelnen Komponente gemacht werden.

*Diese Arbeit sei meinen Eltern Monika und László Nagy
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet*

Danksagung

In erster Linie möchte ich meinen beiden Betreuern, Frau Ao. Univ. Prof. Dr. Sonja Solar und Herrn Univ. Prof. Dr. Gerhard Sontag für die Aufgabenstellung sowie die intensive Begutachtung und ausführliche Korrektur der vorliegenden Arbeit danken.

Ihre intensive Betreuung hat mir die Grundzüge wissenschaftlichen Schreibens vermittelt und mich stets zu gewissenhaftem und genauen Arbeiten angehalten.

Spezieller Dank gebührt auch der gesamten Arbeitsgruppe der Sektion Strahlenbiologie am Institut für Ernährungswissenschaften, Frau Dr. Ruth Maria Quint, Mag. Heike Schittl, Mag. Isolde Sommer, Mag. Johannes Hartmann sowie Ing. Markus Spannbruckner und Prof. Nikola Getoff, die mir nicht nur während dieser Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen, sondern auch für viele interessante Gespräche sorgten und damit die Arbeit in der Gruppe zu einem schönen Abschluss meines Studiums machten.

Univ. Prof. Dr. Jürgen König und Sandra Haselmaier sei für die massenspektrometrischen Messungen und die geduldige Unterstützung bei deren Auswertung gedankt.

Und nicht zuletzt möchte ich herzlich meinen lieben Eltern danken, die mir meine Ausbildung und das Studium der Chemie erst ermöglicht und stets an meine Fähigkeiten geglaubt haben.

INHALT

1 EINLEITUNG	1
<i>1.1 Erkenntnisstand</i>	<i>1</i>
<i>1.2 Zielsetzung.....</i>	<i>4</i>
2 CHEMISCHE UND PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN.....	5
<i>2.1 Strahlenchemie.....</i>	<i>5</i>
2.1.1 Definition der Strahlenchemie	5
2.1.2 Absorption hochenergetischer Strahlung	6
2.1.3 Die strahlenchemische Ausbeute (G-Wert)	7
2.1.4 Radiolyse des Wassers	8
2.1.5 Eigenschaften des OH-Radikals	9
2.1.6 Bildung und Abbau von Peroxylradikalen	10
2.1.7 Radiolyse fester Stoffe.....	11
<i>2.2 Strahlenkonservierung von Lebensmitteln</i>	<i>13</i>
2.2.1 Strahlenquellen.....	13
2.2.2 Dosisbereiche und ihre Verwendungen.....	15
2.2.3 Nachweisverfahren.....	17
2.2.4 Gesetzliche Regelung in der EU und in Österreich.....	20
<i>2.3 Photometrie</i>	<i>24</i>
2.3.1 Absorption von Strahlung im UV und VIS-Bereich	24
2.3.2 Das Lambert Beer'sche Gesetz	24
2.3.3 Apparatives.....	26
<i>2.4 Chromatographie</i>	<i>27</i>
2.4.1 Trennprinzip in der HPLC	27
2.4.2 Kenngrößen der HPLC	27
2.4.2.1 Trennfaktor – Selektivität	28
2.4.2.2 Trennstufenhöhe und Trennstufenzahl	29
2.4.2.3 Trennleistung – Van Deemter Gleichung	29

INHALT

2.4.2.4 Auflösung	30
2.4.3 Reversed Phase Chromatographie	31
2.4.4 Gradientenelution	31
2.4.5 Detektion und Quantifizierung	32
2.5 Massenspektrometrie.....	33
2.5.1 Prinzip der massensensitiven Detektion	33
2.5.2 Quadrupol – Massenfilter	34
2.5.3 Time Of Flight – Analysator	35
2.5.4 ESI – Kopplung mit der HPLC	37
2.5.5 Selected Ion Monitoring	38
3 EXPERIMENTELLER TEIL.....	39
3.1 <i>Materialien</i>	39
3.1.1 Gewürze	39
3.1.2 Chemikalien.....	39
3.2 <i>Bestrahlung und Aufarbeitung der Gewürzproben</i>	40
3.3 <i>Geräte und Analysenmethoden</i>	41
3.3.1 Strahlenquelle.....	41
3.3.2 Spektrophotometer	41
3.3.3 HPLC-DAD.....	42
3.3.4 LC-MS.....	45
3.4 <i>Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes</i>	46
3.4.1 Der Folin-Ciocalteu Test	46
3.4.2 Praktische Durchführung.....	46
3.5 <i>Bestimmung der antioxidativen Aktivität</i>	47
3.5.1 Der Trolox-Äquivalent Test (TEAC)	47
3.5.2 Praktische Durchführung.....	48

INHALT

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	49
<i>4.1 Gesamtphenolbestimmung.....</i>	<i>49</i>
4.1.1 Der Folin-Ciocalteu Test.....	49
4.1.2 Eichgerade	49
4.1.3 Totalphenolgehalt der Gewürzextrakte	50
<i>4.2 Antioxidative Kapazität</i>	<i>52</i>
4.2.1 TEAC-Test	52
4.2.2 Eichgerade	53
4.2.3 TEAC-Werte der Gewürzextrakte	55
<i>4.3 Untersuchungen von unbestrahlten und bestrahlten Gewürzen mittels HPLC... 59</i>	
4.3.1 Literaturübersicht über Inhaltsstoffe von Oregano, Thymian und Salbei	59
4.3.2 Chromatographische Trennung von Standardgemischen	61
4.3.3 Spektroskopische Charakterisierung der Vergleichssubstanzen	64
4.3.4 Analyse von Gewürzen	68
4.3.4.1 Herstellung der Extrakte und HPLC-Methoden	68
4.3.4.2 Chromatographische Trennungen und Detektion der Gewürzinhaltsstoffe	69
4.3.4.3 Identifizierung bzw. Zuordnung der Substanzen	74
4.3.4.4 Mengenmäßige Abschätzung der Hauptkomponenten in unbestrahlten und bestrahlten Gewürzen	82
4.3.5 Zusammenfassung der HPLC-DAD Untersuchungen.....	91
<i>4.4 Untersuchungen an unbestrahlten und bestrahlten Gewürzen mittels LC-MS ... 92</i>	
4.4.1 LC-MS Untersuchung eines Standardgemisches und massen- spektrometrische Charakterisierung der Vergleichssubstanzen.....	92
4.4.2 Identifizierung von Inhaltsstoffen und von deren Derivaten.....	93
4.4.3 Mengenmäßige Abschätzung identifizierter Inhaltsstoffe	104
4.4.4 Vergleich der HPLC-DAD und LC-MS Untersuchungen.....	106

INHALT

5 CONCLUSIO	109
6 LITERATUR	110
7 ANHANG	117
<i>I Abbildungsverzeichnis.....</i>	<i>117</i>
<i>II Tabellenverzeichnis.....</i>	<i>120</i>
<i>III Abkürzungsverzeichnis.....</i>	<i>121</i>
<i>IV Curriculum Vitae</i>	<i>122</i>

EINLEITUNG

1 EINLEITUNG

1.1 Erkenntnisstand

Polyphenole gehören zu den meist verbreiteten und am zahlreichsten vertretenen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Zur Zeit sind über 8000 phenolische Substanzen in der Botanik erfasst, von denen die Flavonoide die größte Gruppe darstellen (Soobrattee et al., 2005). Dabei handelt es sich um aromatische Verbindungen mit zwei oder mehreren direkt an den aromatischen Ring gebundenen Hydroxygruppen. Sie werden von den Pflanzen zum Schutz vor Schädigungen von z.B. Zellkernen und Zellmembranen produziert.

In den Ernährungswissenschaften und der Medizin haben Polyphenole vor allem als Prophylaxe gegen durch *oxidativen Stress* verursachten Störungen Bedeutung erlangt. Darunter versteht man die Entstehung reaktiver Spezies im Zuge der Verbrennung von Nährstoffen mit Sauerstoff in der Atmungskette der Zelle. Die aggressivsten Radikale, die dabei entstehen sind das Hyperoxyd- (früher Superoxid-) Anion, $O_2^{\bullet -}$ und das Hydroxyl-Radikal HO^{\bullet} .

Die biologischen Effekte polyphenolhaltiger Pflanzen bzw. deren Extrakten in der Ernährung reichen von antibakterieller, entzündungshemmender, antiallergischer, antithrombotischer, antiviraler bis hin zu anticarcinogener Wirkung. Der Hauptgrund dafür liegt in ihrer antioxidativen Wirksamkeit, d. h. ihrer Fähigkeit in biologischen Systemen als Radikalfänger, also Antioxidantien zu fungieren. Auch ein Eingreifen in die chemische Signalweiterleitung der Zelle und die Genexpression wurde nachgewiesen (Soobrattee et al., 2005).

Antioxidantien sind Stoffe, die die Oxidation von Molekülen verzögern oder unterbinden, indem sie den Beginn oder das Fortschreiten von oxidierenden Kettenreaktionen verhindern (Zheng & Wang, 2001). Die genannten Verbindungen mit phenolischen Hydroxylgruppen bilden dabei durch H^{\bullet} Übertragung auf reaktive Sauerstoffverbindungen resonanzstabilisierte Phenoxyl-Radikale, die selbst für eine H-Abstraktion aus anderen Molekülen, wie z.B. ungesättigten Fettsäuren, Lipiden, Proteinen oder DNA zu reaktionsträge sind (Abb. 1.1.1). Manche Phenoxylradikale können auch disproportionieren: $XH^{\bullet} + XH^{\bullet} \rightarrow X + XH_2$.

EINLEITUNG

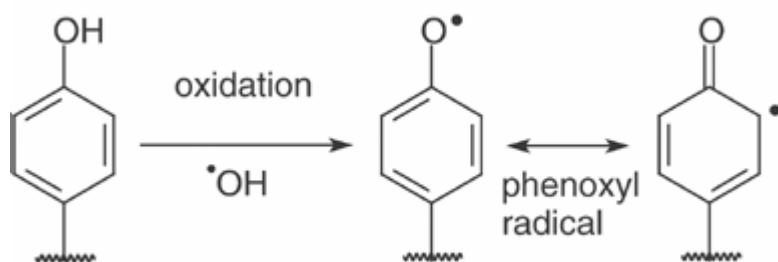


Abb. 1.1.1 : Entstehung von resonanzstabilisierten Phenoxylradikalen aus phenolischen Antioxidantien (Mikkelsen et al., 2003).

Viele Gewürze und (Heil-) Kräuter haben sich als besonders reich an Polyphenolen wie Flavonoiden und Phenolsäuren (insbesondere Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren) erwiesen. Es existieren zahlreiche Arbeiten, die sich mit der Analyse ihrer antioxidativen Aktivität und ihrer Inhaltsstoffe befassen (Yanishlieva et al., 2006). Es zeigt sich stets ein linearer Zusammenhang zwischen der antioxidativen Wirksamkeit und dem Totalphenolgehalt im Gewürz. Dabei nimmt die antioxidative Kapazität, beschrieben durch die *Trolox Equivalent Antioxidative Capacity*, den TEAC-Wert, (siehe Kapitel 3.5) in der Reihenfolge Flavanoole > Flavonoole > Hydroxyzimtsäuren > einfache Phenolsäuren ab, wobei sich bei den Phenolsäuren Gallussäure und Rosmarinsäure als die besten Radikalfänger erwiesen. Hier wurde die Reihenfolge Rosmarinsäure > Kaffeesäure > Cumarsäuren gefunden. Die antioxidative Kapazität ist dabei eine Funktion der Anzahl vorhandener Hydroxygruppen und ihrer Position am Ring (Soobrattee et al., 2005).

Gallussäure dient meist als Referenzsubstanz für die Angabe des Gesamtphenolgehalts einer Probe (Kapitel 3.4) und Rosmarinsäure ist einer der Hauptbestandteile der in dieser Arbeit untersuchten Gewürze. Rosmarin wurde dabei von allen polyphenolhaltigen Gewürzen am intensivsten erforscht und seine Extrakte gehören zu den ersten vermarkteten natürlichen Antioxidationsmitteln. Rosmarin ist das einzige Gewürz, dessen Extrakte in Europa und den USA kommerziell verfügbar sind (Yanishlieva et al., 2006).

Aber auch andere Gewürze aus der Familie der *Labiatae* (Lippenblütler), wie die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, Oregano, Thymian und Salbei zeigen einen extrem hohen Anteil an diesen sekundären Pflanzenstoffen. Viele der phenolischen

EINLEITUNG

Verbindungen sind auch in wässriger Phase löslich, weshalb sie seit jeher als Heilkräuter in Tees genutzt werden.

Eine der effizientesten Methoden, diese Gewürze für den Versand und Verkauf vor Mikroben- und Pilzbefall zu schützen, ist, nach der Gefriertrocknung und Lagerung unter Schutzatmosphäre, eine Bestrahlung mit ionisierender Strahlung (^{60}Co -Gamma-, bzw. Elektronenstrahlung), wobei die maximal erlaubte Dosis in der Europäischen Union für Gewürze 10 kGy beträgt (Kapitel 2.2).

Im Gegensatz zur Analyse ihrer Inhaltsstoffe und ihrer gesundheitsförderlichen Wirkung findet man wenige Untersuchungen darüber, ob diese erwünschten Effekte durch die Strahlenkonservierung abnehmen.

Es werden unterschiedliche Extraktions- und Testverfahren eingesetzt und die Strahlendosis in Erwartung möglicher Effekte weit über das erlaubte Maß gesteigert. Die Resultate sind widersprüchlich. Bei der Untersuchung von Zimt zeigen sich keine Änderungen des antioxidativen Potentials nach einer Bestrahlung von bis zu 25 kGy (Kitazuru et al., 2004). Dabei wurden Ether, Ethanol und wässrige Extrakte mit dem Beta-Karotin / Linolsäure Test untersucht. Ebenso zeigen Untersuchungen an Anis, Vanille, Muskat, Lakritze, Ingwer, Zimt und Minze, die mit 10 kGy bestrahlt und mit Wasser extrahiert wurden keine Abnahme an antioxidativer Wirksamkeit (TEAC) in Bezug auf die Radikale ROO^{\bullet} , $\text{}^{\bullet}\text{OH}$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ und Wasserstoffperoxyd (Murcia et al., 2004). Auch bei getrockneten Proben von Rosmarin und Basilikum zeigen sich zumindest in ihrer therapeutischen Wirkung (pharmakologische Tests) keine Änderungen bis hin zu 30 (!) kGy, wenngleich der Totalphenolgehalt bei Rosmarin bereits ab einer Dosis von 10 kGy leicht abnimmt (Koseki et al., 2002). Im Gegensatz dazu wurden bei methanolischen Extrakten von schwarzem Pfeffer signifikante Änderungen in der antioxidativen Kapazität (TBARS) nach der Bestrahlung des Trockengewürzes: 23% nach 10 kGy und ein Drittel nach 30 kGy beobachtet (Suhaj et al., 2006). Andere Untersuchungen zeigen Abnahmen an Ascorbat und Carotinoiden durch Bestrahlung mit 10 kGy, was ebenfalls Einfluss auf die antioxidative Wirkung haben kann (Calucci et al., 2003).

EINLEITUNG

1.2 Zielsetzung

Es sollen, ausgehend von der Arbeit von B. Shan et al., 2005, methanolische Extrakte getrockneter, ansonsten unbehandelter Gewürzproben von Oregano, Thymian und Salbei, (Fa. Kottas, 1010 Wien), sowie frischer und dann innerhalb von 24 Stunden nach der Ernte gefriergetrockneter Gewürzproben aus eigenem Anbau von Oregano, Thymian, Salbei und Rosmarin auf ihren Totalphenolgehalt, ihre antioxidative Kapazität und ihre Inhaltsstoffe vor und nach einer Bestrahlung mit 10 kGy untersucht werden. Eventuelle Änderungen (Abnahmen) sollen als Hinweise für eine Schädigung durch die Strahlenkonservierung gewertet werden.

2 CHEMISCHE UND PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Strahlenchemie

2.1.1 Definition der Strahlenchemie

Unter Strahlenchemie versteht man den Teil der Chemie, der sich mit den Wirkungen, die durch die Absorption ionisierender Strahlung in Materie hervorgerufen werden, befasst.

Man spricht deshalb von ionisierender Strahlung, da ihre Energie die Ionisierungsenergie der Atome und Moleküle der Materie weit übersteigt.

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.1.1)$$

($h=4,136 \times 10^{-15}$ eVs und $c=3 \times 10^{10}$ cms⁻¹)

Umrechnung von Energie und Wellenlänge: $E[\text{eV}] = 1,24 \times 10^3 / \lambda[\text{nm}]$

Dabei steigt die Energie E der Strahlung mit ihrer Frequenz ν bzw. dem Impuls p (prop. der Geschwindigkeit $p=mv$) des Teilchens. Licht (sichtbar, UV), das zwischen 780 und 200 nm absorbiert wird, entspricht einer Energie von 1,6-6,2 eV. Bei Absorption werden Elektronen in energetisch höher liegende Orbitale angehoben. Die Energie der Gamma-Quanten von ⁶⁰Co liegt bei 1,1 und 1,3x10⁶ eV, was viel höher als die Ionisierungsenergie von Atomen und die Bindungsenergie zwischen Atomen in Molekülen ist. Die Wellenlänge elektromagnetischer Strahlung nimmt mit steigender Energie ab (Gl. 2.1.1). Die ionisierende Strahlung besteht entweder aus sehr hochfrequenten elektromagnetischen Wellen (Röntgen- und Gammastrahlung) <1 nm oder Teilchen mit hoher kinetischer Energie (Elektronen, Protonen, Neutronen, alpha-Teilchen usw.) von 10⁴-10⁷ eV.

Man unterscheidet aufgrund der andersartigen Wechselwirkung zwischen *direkt ionisierender* Strahlung geladener Teilchen und *indirekt ionisierender Strahlung* ungeladener Teilchen oder Photonen.

GRUNDLAGEN

Während schnelle geladene Teilchen ihre Energie via Coulomb-Wechselwirkung direkt an die Atome oder Moleküle entlang ihrer Bahn abgeben, und so zu Ionisationen führen, übertragen ungeladene Teilchen und elektromagnetische Wellen ihre Energie zunächst an geladene Teilchen (zumeist Elektronen), die dann in der zweiten Stufe des Prozesses ionisierend wirken.

2.1.2 Absorption hochenergetischer Strahlung

Mathematisch gehorcht die Absorption energiereicher Photonen einem exponentiellen Gesetz. Dabei nimmt die Zahl der Photonen N von anfänglich N_0 mit der Schichtdicke x (in cm) wie folgt ab:

$$-\frac{dN}{N} = \mu dx \quad (2.1.2) \quad \text{bzw.} \quad N(x) = N_0 e^{-\mu x} \quad (2.1.3)$$

Dabei ist μ der so genannte lineare Schwächungskoeffizient in cm^{-1} . Wenn man anstatt der Dicke der Schicht das Gewicht eines Quadratzentimeters verwendet, um die Schwächung der Strahlung mit der Eindringtiefe auszudrücken, kommt man analog zur Flächendichte ζ in g cm^{-2} und dem Massenschwächungskoeffizienten μ_m in $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ der einfach μ durch die Materialdichte in g cm^{-3} ist: $\mu_m = \mu/\rho$. Damit erhält man wie oben

$$N(\zeta) = N_0 e^{-\mu_m \zeta} \quad (2.1.4)$$

Der Schwächungskoeffizient ist eine Funktion der Photonenenergie und der Materialeigenschaften. Drei Elementarprozesse tragen dazu bei: Photoeffekt, Compton-Streuung und Paarbildung. Um die Eindringtiefen von Gamma- bzw. Röntgenstrahlung zu berechnen, gibt man aufgrund des exponentiellen Abnahmeverhaltens die Halbwertsdicke in cm an, bei der die Zahl der einfallenden Photonen N_0 auf die Hälfte reduziert wurde.

$$x_{1/2} = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2.1.5)$$

GRUNDLAGEN

Die Abstopfung eines hochenergetischen geladenen Teilchens wird durch seinen spezifischen Energieverlust $-dE/dx$ beschrieben. Man spricht auch vom LET (linear energy transfer). Der Energieverlust ist dabei indirekt proportional der kinetischen Energie des geladenen Teilchens und daher am Ende seiner Bahn am größten – es werden umso mehr Ionenpaare gebildet je weiter das Teilchen ins absorbierende Material eingedrungen ist.

Das geladene Teilchen verliert seine kinetische Energie großteils aufgrund von Anregung und Ionisation der Elektronen des Materials. Auch elastische Stöße mit den Atomkernen spielen eine Rolle – ihr Anteil an der Energieabnahme ist aber sehr gering ($<1\%$). Bei Materialien mit schweren Kernen und hoher Teilchenenergie ($>10\text{--}100\text{ MeV}$) kommt als dritter Effekt die Bremsstrahlung hinzu, wobei die kinetische Energie des im Coulombfeld des Kerns abgelenkten Teilchens teilweise bis vollständig in elektromagnetische Strahlung umgewandelt wird. In Tabelle 2.1.1 ist die Halbwertsschichtdicke bzw. Reichweite für Photonen bzw. Elektronen gleicher Energie in unterschiedlichen Materialien angegeben.

Energie	Reichweite von Elektronen in			$x_{1/2}$ für Photonen in	
[MeV]	Luft [m]	Wasser [cm]	Blei [mm]	Wasser [cm]	Blei [mm]
0,1	0,1	0,015	0,03	4,5	0,1
0,5	1,5	0,2	0,3	8	5
1	2	0,5	0,6	10	10
5	20	2,5	2,5	20	11
10	40	5	5	30	11

Tabelle 2.1.1 : Reichweite von Elektronen und elektromagnetischer Strahlung in Materie

2.1.3 Die strahlenchemische Ausbeute (G-Wert)

Die strahlenchemische Ausbeute wird durch den G-Wert definiert (Gl. 2.1.6). Er entspricht der Anzahl der bei einer strahlenchemischen Reaktion pro 100 eV absorbierter Strahlungsenergie E_{abs} umgesetzten Moleküle N .

GRUNDLAGEN

Der G-Wert wird in $\mu\text{mol J}^{-1}$ angegeben. Bei einem G-Wert von 1 wird 1 Molekül pro 100 eV absorbiert Strahlung umgesetzt, das sind $0,1036 \mu\text{molJ}^{-1}$ (1 Elektronvolt entspricht in SI-Einheiten einer Energie von $1,602 \times 10^{-19} \text{ J}$).

$$G = 100 \frac{N}{E_{abs}} \quad (2.1.6)$$

Die Einheit der absorbierten Energiedosis ist das Gray ($1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad} = 1 \text{ Jkg}^{-1} \text{ Stoff}$), die der Dosisleistung $1 \text{ rads}^{-1} = 0,01 \text{ Gys}^{-1} = 0,01 \text{ Jkg}^{-1}\text{s}^{-1}$, was der absorbierten Dosis pro Zeiteinheit entspricht.

2.1.4 Radiolyse des Wassers

Betrachtet man die Auswirkung ionisierender Strahlung auf Moleküle in wässriger Lösung, so gehen (bei kleinen Konzentrationen $< 1 \text{ mol/l}$) so gut wie alle Reaktionen von mehr oder weniger kurzlebigen Spezies aus, die aus den Wassermolekülen entstehen, da diese im Vergleich zu den gelösten Substanzen in großem Überschuss vorliegen. Man bezeichnet die Transienten die 10^{-7} s nach Absorption der Strahlung homogen verteilt vorliegen als Primärprodukte der Wasserradiolyse (Abb. 2.1.1 unten). Es werden dabei etwa in gleichem Ausmaß oxidierende ($\cdot\text{OH}$, H_2O_2) bzw. reduzierende ($\text{H}\cdot$, e_{aq}^-) Spezies gebildet (siehe Tab. 2.1.2).

Da alle biologischen Systeme zu einem Großteil aus Wasser bestehen, sind Strahlenschäden an lebenden Organismen und in der Folge auch in wasserhaltigen Nahrungsmitteln zu einem großen Teil auf die Reaktionen dieser Primärprodukte mit Inhaltsstoffen zurückzuführen. Das Ausmaß ihrer Bildung, also ihr G-Wert, ist pH-abhängig. Deshalb bilden sich bei niedrigem pH-Wert H-Radikale auf Kosten von e_{aq}^- und bei hohem pH-Wert e_{aq}^- auf Kosten von H-Atomen ($\text{e}_{\text{aq}}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}\cdot$ und $\text{H}\cdot + \text{OH}^- \rightarrow \text{e}_{\text{aq}}^-$). Bei Anwesenheit von Luftsauerstoff ist der Strahlenschaden noch um einiges größer, da aus den reduzierenden Transienten $\text{H}\cdot$ bzw. e_{aq}^- OH-Radikale, Hydroperoxylradikale ($\text{HO}_2\cdot$) bzw. Peroxylradikalanionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) gebildet werden, wobei letztere eine hohe Reaktivität mit Metallionen biologischer Moleküle aufweisen.

GRUNDLAGEN

pH	e_{aq}^-	$\cdot H$	$\cdot OH$	H_2	H_2O_2
1	-	3,7	3	0,41	0,78
7	2,8	0,6	2,9	0,47	0,73
14	3,3	-	3,4 ($O^{\cdot -}$)	0,47	0,73 (HO_2^-)

Tabelle 2.1.2 : pH-Abhängigkeit des G-Wertes der Primärprodukte der Wasserradiolyse (Angaben in $10^{-7} \text{ molJ}^{-1}$)

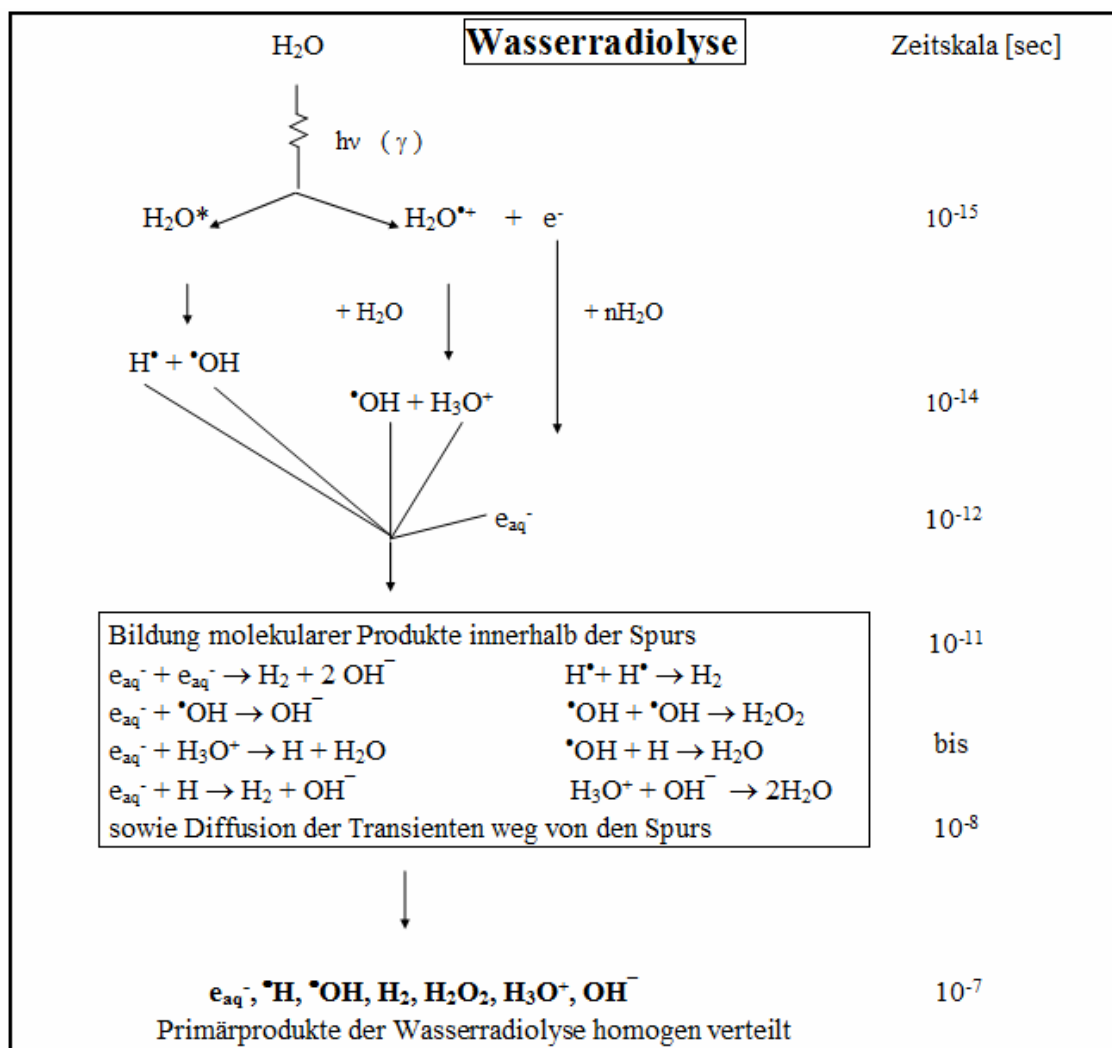


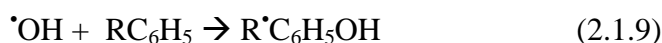
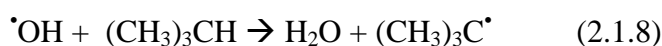
Abb. 2.1.1 : Radiolyse des Wassers

2.1.5 Eigenschaften des OH-Radikals

Da in dieser Arbeit ausschließlich die Auswirkung von Strahlung auf organische Moleküle in Anwesenheit von Sauerstoff untersucht wurde, ist die Chemie der OH-

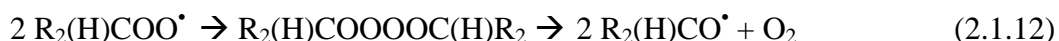
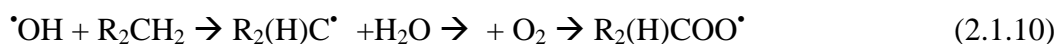
GRUNDLAGEN

Radikale (neben HO_2^\bullet bzw. $\text{O}_2^{\bullet-}$) wohl am wichtigsten, um die Bildung möglicher Bestrahlungsprodukte vorherzusagen. Das OH-Radikal ($^\bullet\text{OH}$) ist elektrophil und daher ein Oxidationsmittel ($E_0 = +2,8 \text{ V}$ in saurer Lösung). Während es von anorganischen Anionen Elektronen abstrahiert (Gl. 2.1.7), kommt es bei aliphatischen organischen Molekülen zur Wasserstoffabstraktion, wobei Wasser und das entsprechende organische Radikal entstehen (Gl. 2.1.8). Im Falle von ungesättigten bzw. aromatischen Verbindungen bilden sich Additionsprodukte (Gl. 2.1.9).



2.1.6 Bildung und Abbau von Peroxylradikalen

Wenn HO_2^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ und $^\bullet\text{OH}$ mit organischen Substanzen unter H-Abstraktion oder Addition reagieren, entstehen vorerst kohlenstoffzentrierte organische Radikale (mit energetisch günstiger Mesomeriestabilisierung), die mit dem gelösten Sauerstoff Peroxylradikale ($\text{R}_2(\text{H})\text{COO}^\bullet$) bilden (Gl. 2.1.10). Diese reagieren dann durch H-Abstraktion zu Hydroperoxid (Gl. 2.1.11) oder je nach Struktur (z.B. α -ständige OH-Gruppen) durch Eliminierung kleinerer Radikale (z.B. HO_2^\bullet) bzw. nach Dimerisierung zum Tetroxid (4-O-Bindung, Gl. 2.1.12) letztendlich zu Aldehyden, Ketonen oder Alkoholen bzw. Dimeren (2.1.13). Durch Fragmentierungsreaktionen entstehen immer kleinere Moleküle (Essigsäure, Ameisensäure) bis zur Mineralisierung in CO_2 und H_2O (Gl. 2.1.14 und 2.1.15).



2.1.7 Radiolyse fester Stoffe

Anders als in Lösungen, wo die gebildeten freien Radikale, Elektronen und Ionen nur für Bruchteile von Milli- oder Mikrosekunden existieren bis sie durch Diffusion miteinander oder mit gelösten Stoffen reagieren, ist deren Lebensdauer in Medien hoher Viskosität, wie z.B. Gläsern bzw. in kristallinen Festkörpern erheblich größer.

Das macht es möglich, die Radikale lange Zeit nach ihrer Entstehung beispielsweise mit Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR) oder Thermolumineszenz (TL) sowohl qualitativ als auch quantitativ nachzuweisen. Beides sind wichtige Methoden zum Nachweis einer Strahlenbehandlung bei Lebensmitteln (Kapitel 2.2.3).

Äußerlich erkennt man das bei vielen Feststoffen an einer Verfärbung, die durch Festhalten von Elektronen an *Störstellen* hervorgerufen wird. Es treten jedoch auch Änderungen der mechanischen Eigenschaften, der elektrischen und der Wärmeleitfähigkeit und sogar der chemischen Reaktionsfähigkeit auf.

Generell werden zwei Arten von natürlichen Störstellen unterschieden: Beim *Frenkel-Defekt* sitzt ein Ion (wegen des geringeren Ionenradius in der Regel ein Kation) auf einer metastabilen Position zwischen regulären Gitterplätzen, man spricht von einer *interstitialen* Position, und lässt dabei eine freie Stelle – eine Kationenvakanz – zurück. Beim *Schottky-Defekt* fehlen gleich viele Anionen wie Kationen an ihren regulären Gitterplätzen. Solche Vakanzien sind von *Löchern* zu unterscheiden. Unter einem Loch versteht man eine Elektronenfehlstelle, die z. B. im NaCl-Kristall durch Entfernen eines Elektrons eines Chlorid-Ions entsteht. Dadurch stellt das Chlor-Atom eine Fehlstelle dar, die gegenüber dem Normalzustand im Gitter positiv geladen ist – man spricht von einem *positiven Loch*. Entsprechend stellt ein Natrium Atom ein *negatives Loch* dar.

Bestrahlung führt im Kristall zur Freisetzung von Elektronen, die bei ihrer Wanderung durch den Kristall abwechselnd positive wie negative Ladungsträger passieren. Kommt das Elektron in die Nähe einer Anionenvakanz, wird es von ihrem positiven Feld angezogen, und dort festgehalten.

Das System besitzt ähnliche Eigenschaften wie ein Wasserstoffatom. Das Elektron kann zwischen diskreten Energieniveaus im Feld der positiven Fehlstelle wechseln und dabei elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichts

GRUNDLAGEN

absorbieren, was zu einer Verfärbung des Kristalls führt (NaCl: Gelbfärbung, Absorptionsmaximum bei 458 nm).

In Abb. 2.1.2 ist die Absorptionsänderung eines NaCl-Kristalls nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen abgebildet. Der nicht-lineare Teil am Anfang der Kurve entspricht dem raschen Auffüllen der bereits im Kristall vorhandenen Störstellen mit den durch steigende Dosis herausgeschlagenen Elektronen. Bei weiterer Bestrahlung entstehen kontinuierlich neue Fehlstellen, die sofort nach ihrer Entstehung aufgefüllt werden, was den langsameren, linearen Anstieg der Absorptionskurve erklärt.

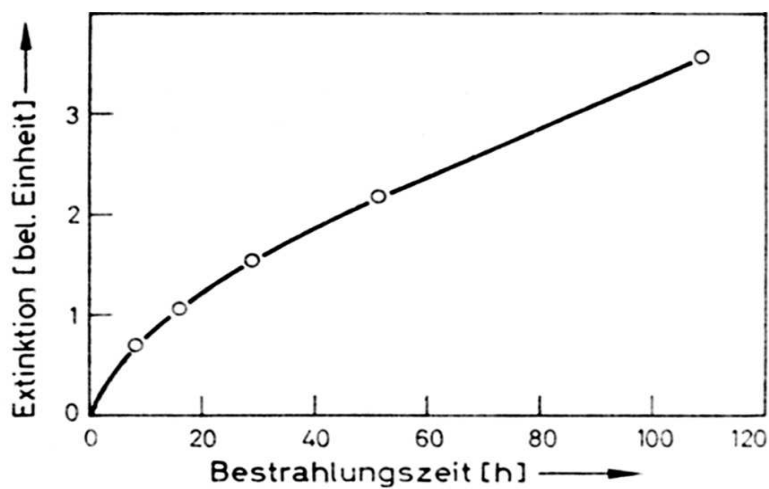


Abb. 2.1.2 : Zunahme der Absorption eines NaCl-Kristalls bei 458 nm in Abhängigkeit von der Dosis (Henglein, 1969, p. 266). Die Dosisleistung betrug hier $1,9 \times 10^5$ R/h.

2.2 Strahlenkonservierung von Lebensmitteln

2.2.1 Strahlenquellen

Zur Bestrahlung von Lebensmitteln werden folgende Strahlenquellen verwendet: Elektronenbeschleuniger (10 MeV), die Radioisotope ^{60}Co und ^{137}Cs , sowie Röntgenstrahlungsquellen (Codex Stan 106-1983).

Die Anlagen zur Bestrahlung bestehen in der Regel aus der Strahlenquelle, dem Bestrahlungsraum, einem Transportsystem, sowie, im Falle von Kobalt-Bestrahlungseinrichtungen, einem Becken mit Wasser zur Lagerung der Quelle. Abb. 2.2.1 zeigt eine ^{60}Co -Bestrahlungsanlage und Abb. 2.2.2 eine Elektronenbestrahlungsanlage.

Bei Elektronenbeschleunigern hängt die maximale Eindringtiefe von der Primärenergie ab und beträgt für Bestahlungsgut mit der Dichte 1 $\sim 0,5$ cm/MeV. Bei beidseitiger Bestrahlung kompakter Lebensmittel mit Höchstenergie können daher maximal 10 cm durchstrahlt werden. Bei dichterem Material noch weniger. Daher werden Elektronenbeschleuniger häufig für tiefgekühlte Lebensmittel verwendet, die rasch auf Förderbändern in dünnen Schichten am Beschleunigerstrahl vorbeigeführt werden, was die Kühlkette nicht unterbricht (im Gegensatz zur längeren Verweilzeit im Bestrahlungsraum bei Bestrahlung mit radioaktiven Quellen). Bei Gamma-Quellen ist die Dosisleistung vergleichsweise gering – sie werden daher großflächig mit längeren Bestrahlungszeiten eingesetzt (Heiss & Eichner, 2002).

Die Eindringtiefe von Gammastrahlung ist um einiges höher als von Elektronenstrahlung. Bei ^{60}Co als Strahlenquelle beträgt die Energie der Photonen 1,17 und 1,33 MeV, die durchschnittliche Energie ist 1,25 MeV und die Halbwertsschichtdicke beträgt 11 cm (Woods & Pikaev, 1994).

Kommerziell genutzt wurde die Bestrahlung erstmals 1957 (!) in Stuttgart für Gewürze. Dabei verwendete man einen van de Graaff-Elektronenbeschleuniger. Die Anlage musste jedoch bald stillgelegt werden, da die Bestrahlung von Lebensmitteln verboten wurde (Diehl, 2002).

GRUNDLAGEN

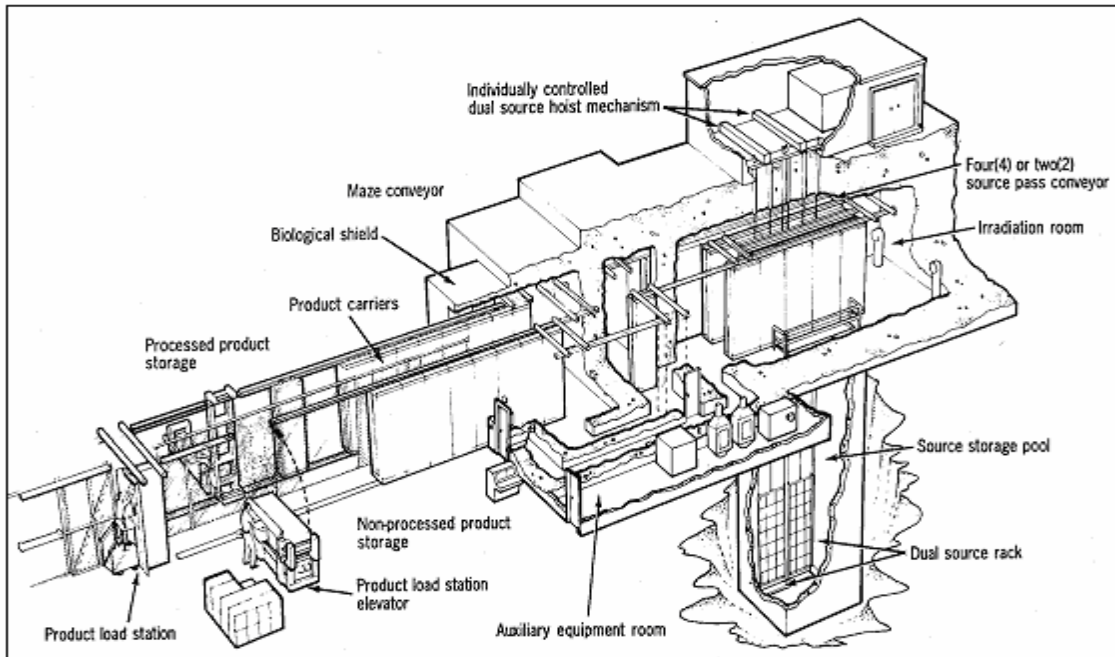


Abb. 2.2.1 : ^{60}Co -Bestrahlungsanlage (Spinks, J.W.T., Woods, R.J., 1990, p. 26)

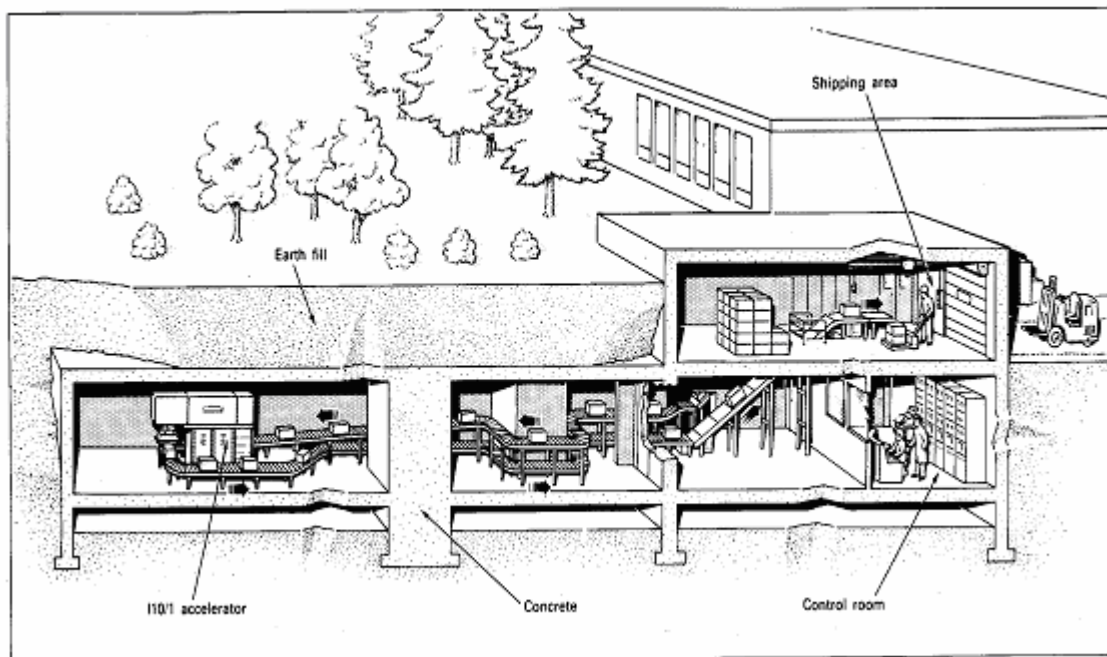


Abb. 2.2.2 : Elektronen-Bestrahlungsanlage (Spinks, J.W.T., Woods, R.J., 1990, p.30)

In Sioux City, Iowa, werden seit dem Jahr 2000 Hamburger im tief gefrorenen Zustand mit Elektronen bestrahlt (SureBeam Corporation). Der Durchsatz der Anlage beträgt dabei 100.000 Tonnen Fleisch pro Jahr. In Hawaii ist seit 2000 eine Röntgenbestrahlungsanlage in Betrieb. Dort werden aus Quarantänegründen tropische

GRUNDLAGEN

Früchte wie Papayas bestrahlt, bevor sie aufs amerikanische Festland verschifft werden, um die Ausbreitung der Hawaiianischen Fruchtfliege zu verhindern. Davor mussten die Früchte im unreifen Zustand geerntet und mehrere Stunden lang mit Dampf durcherhitzt werden, um die Larven im Inneren zu töten, worunter allerdings die Qualität der Ware abnahm (Diehl, 2002).

2.2.2 Dosisbereiche und ihre Verwendungen

Je nach gewünschtem Effekt und Beschaffenheit sowie Strahlenempfindlichkeit werden unterschiedliche Dosen bei der Lebensmittelstrahlung eingesetzt. Zur allgemeinen Konservierung werden Dosen bis zu 10 kGy verwendet. Folgende Anwendungsbereiche werden unterschieden (Heiss & Eichner, 2002; Ehlermann & Delincée 1999):

- 50-150 Gy: Vermeidung des Auskeimens (*sprouting inhibition*) von z. B. Kartoffeln, Yamwurzeln, Zwiebeln und Knoblauch. Auch das Grünwerden im Licht wird gehemmt. Wegen der nötigen Eindringtiefe werden Kobalt-Quellen benutzt. Die Früchte sollten schon in Kisten lagern, um nicht mehr verletzt zu werden, da nach der Bestrahlung keine Wundheilung mehr stattfindet.
- 100-1000 Gy: Reifeverzögerung (*delay ripening*). Eine solche tritt beispielsweise bei manchen Bananensorten (5-6 Tage, Dosis: 400 Gy), weiters bei Mango, Guave, Papaya, Avocado oder Pilzen auf.
- 300-1000 Gy: Schädlingsbekämpfung (*disinfestation*) bei Getreide, Trockenfrüchten, Kaffeebohnen, Nüssen oder Cerealien. Durch Bestrahlung erfolgt die Vernichtung von Insekten/Insektenlarven auch im Inneren der Früchte (z.B. Eier der Fruchtfliegen, Mangokäfer im Kern), wo sie durch Begasung mit chemischen Schädlingsbekämpfungsmitteln nicht getötet werden.
- 1-10 kGy: Keimzahlverminderung (*microbial control*) Verderbnis erregender und pathogener Mikroorganismen. Dient zur Haltbarkeitsverlängerung vieler, teilweise hitze-empfindlicher Produkte als Alternative zur Pasteurisierung.

GRUNDLAGEN

Durch eine Keimzahlverminderung Verderbnis erregender Mikroorganismen erreicht man eine Verlängerung der mikrobiologischen Haltbarkeit bei Kaltlagertemperaturen zwischen 0 und 5°C (Strahlenpasteurisierung bzw. *radurization*). So wird die Haltbarkeit von frisch gefangenen Seefisch bei 0°C von 10 Tagen auf das Doppelte verlängert, wenn die Bestrahlung (1 kGy) sehr rasch nach dem Fang bzw. der Verarbeitung erfolgt, da die Keimzahl zu diesem Zeitpunkt noch gering ist.

Bei Geflügel- und Eiprodukten ist das Ziel eine möglichst vollständige Vernichtung pathogener, nicht sporenbildender Bakterien, in erster Linie von Salmonellen und *E. coli* zu erreichen (Desinfektion bzw. *radicidation*). Zwar würde bei Lagertemperaturen von 5°C die Haltbarkeit von frisch ausgenommenem Geflügel mit einer Dosis von 5 kGy auf das Doppelte verlängert, was aber aus geschmacklichen Gründen schon zu hoch wäre. Deshalb bestrahlt man tiefgekühlt und in Vakuumverpackung.

Der größte Anwendungsbereich von Dosen bis zu 10 kGy liegt in der Konservierung von (gefrier-)getrockneten Kräutern und Gewürzen. Eine Strahlenbehandlung ist hier die einzige Alternative zur bisher üblichen Begasung mit Ethylenoxyd, bei der als Folge die Entstehung des karzinogenen Ethylenchlorhydrins nachgewiesen wurde. Man benötigt 8 kGy, um die Keimzahl um mindestens 4 Zehnerpotenzen zu reduzieren. Die Notwendigkeit der Bestrahlung liegt hier in der häufigen Verwendung von Gewürzen in Fleischwaren und Käsezubereitungen, bei denen eine hohe Keimzahl zum raschen Verderb führen würde.

- 10-50 kGy Dosen dienen zum Sterilisieren von Fleisch für spezielle Anwendungen wie Raumfahrt und Krankenhausdiäten (Strahlensterilisation bzw. *radappterisation*). Speziell für immunschwache Patienten wird eine nahezu keimfreie Kost benötigt. Für eine zusätzliche Enzymdesaktivierung zum Schutz vor Verderb ist eine Vorerhitzung bis zu 75°C nötig. Zwar wäre bei dieser Temperatur eine viel geringere Strahlendosis zur Entkeimung nötig, jedoch würden dabei sensorische Veränderungen (Geschmack, Geruch, Konsistenz) auftreten. Der Schwellenwert liegt bei einer Temperatur von 5 bis 10°C bei ca. 2 kGy. Man kann bei -30°C mit hoher Dosis bestrahlen, da die Wirkung freier Radikale gehemmt wird und keine sensorischen Beeinträchtigungen auftreten.

GRUNDLAGEN

Bestrahlung ist nicht einsetzbar für eine Inaktivierung von Enzymen, den Abbau von Toxinen oder die Abtötung von Viren, da die dazu benötigten Strahlendosen (z.B. 80 kGy um das *Clostridium botulinum* Toxin zu 99% zu zerstören) in vielen Lebensmitteln unerwünschte Veränderungen bewirken würden, die bis zur Un genießbarkeit führen könnten.

2.2.3 Nachweisverfahren

Der Nachweis einer Behandlung mit ionisierender Strahlung dient zur Überprüfung der Einhaltung der gesetzlichen Bestimmungen (Dosisbestimmungen, Bestrahlungsverbote, Kennzeichnungspflicht, siehe Kapitel 2.2.4).

Die analytischen Verfahren zum Nachweis einer Strahlenbehandlung bei Lebensmitteln lassen sich in physikalische, chemische und biologische Methoden einteilen, die je nach Beschaffenheit der Lebensmittelprobe zum Einsatz kommen (Haire et al, 1997; Delincée, 2002). Es werden hier nur einige kurz besprochen, die in Europa als genormte Verfahren zur Verfügung stehen (Max Rubner-Institut, 2008).

PHYSIKALISCHE METHODEN:

Beruhend darauf, dass *in* Festsubstanzen in Lebensmitteln (z.B.: Knochen, Gräten, Schalen, Samen, Kernen) oder *an* den Lebensmitteln anhaftenden Mineralpartikeln (Silikatkristalle) durch Bestrahlung langlebige Radikale entstehen.

Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)

ESR-Spektroskopie ist eine Methode zur qualitativen und quantitativen Detektion *freier Radikale*. Die Methode ist äußerst selektiv und sehr empfindlich (Nachweisgrenze: $\sim 10^{-8}$ mol/l). Sie ist schnell und nicht invasiv (Haire et al., 1997).

PRINZIP:

Radikale besitzen zumindest ein ungepaartes Elektron und damit einen Gesamtspin, also ein permanentes magnetisches Moment. Befindet sich ein solches Radikal im äußeren Magnetfeld des ESR-Spektrometers, spalten sich die

GRUNDLAGEN

beiden sonst energieentarteten Spinzustände auf (*Zeemann-Effekt*), wobei sich der magnetische Dipol in Feldrichtung oder entgegengesetzt ausrichten kann (*Raumquantisierung*). Die Ausrichtung in Richtung des äußeren Feldes ist energetisch begünstigt, daher liegen im thermischen Gleichgewicht (*Boltzmann-Verteilung*) etwas mehr Radikale in diesem Zustand vor. Durch Mikrowellenabsorption geeigneter Frequenz (*Resonanzfall*) können ihre Spins in den entgegengesetzten Zustand übergehen. Je mehr Radikale in der Probe enthalten sind, desto größer ist diese Absorption (Demtröder, 2000).

Laut EU-Gesetzgebung sind folgende genormte Methoden zulässig: ESR-Spektroskopie von CO₂-Radikalen in Knochen bzw. Gräten (DIN EN 1786 : 1997 – 03), ESR-Spektroskopie von kristalliner Cellulose (DIN EN 1787 : 2000 – 07) z.B. in Samen, Schalen und Kernen sowie ESR-Spektroskopie von kristallinem Zucker (DIN EN 13708 : 2002 – 01), beispielsweise in getrockneten Feigen, Papayas oder Mangos.

- Bestrahlte Knochen erkennt man an einem typischen asymmetrischen Signal der CO₂ Radikale in der Hydroxylapatitmatrix.
- Bestrahlte Cellulose-Proben erkennt man an einem Linienpaar („Satellitenpeaks“) links und rechts eines zentralen Signals, wobei der Abstand der beiden Linien voneinander etwa 6,0 mT (milli-Tesla) beträgt.
- Zucker in bestrahlten Trockenfrüchten erkennt man an typischen komplexen Multikomponenten-Spektren, während unbestrahlte Proben keine ESR-Signale oder nur ein breites Einzelsignal aufweisen.

Thermolumineszenz (TL):

Thermolumineszenz ist die Methode zum Nachweis einer Bestrahlung an Silikatmineralien (DIN EN 1788 : 2002 – 01). Wie schon in Kapitel 2.1.7 erwähnt wurde, werden die durch Bestrahlung freigesetzten Elektronen an Fehlstellen im Kristall festgehalten und dadurch die Bestrahlungsenergie gespeichert. Diese Energie kann später durch kontrolliertes Erhitzen des Kristalles auf ca. 200°C bis 400°C wieder freigesetzt werden. Ein Teil davon wird durch Photonenemission im sichtbaren Wellenlängenbereich, das Thermolumineszenzlicht, abgegeben. Auftragen der Lumineszenzintensität (Photonenzahl) vs. Temperatur gibt die so genannte *Glühkurve*.

GRUNDLAGEN

Für diese Methode ist es von Nöten, die mineralischen Bestandteile vor der Untersuchung von den organischen zu trennen, um Störlumineszenzen auszuschalten. Daher kann die Probenvorbereitung sehr aufwändig sein. Es ist keine Referenz nötig – die Kalibrierung erfolgt durch erneutes Bestrahlen und Messen der Lumineszenz mit verschiedenen Dosen für eine bestimmte Materialprobe. Das TL–Verfahren kann zum Nachweis einer Strahlenbehandlung prinzipiell auf jedes Lebensmittel angewandt werden, von dem Silikatmineralien isoliert werden können, z.B. auf Kräuter und Gewürze bzw. Gewürzmischungen, Krebs– und Weichtiere einschließlich Garnelen, Frisch– und Trockenobst sowie Gemüse.

CHEMISCHE METHODEN:

Chemische Methoden beruhen auf dem Nachweis von Stoffen, die durch die Strahlenbehandlung gebildet werden. Eine gängige Methode ist hier der Nachweis von Kohlenwasserstoffen, die durch direkte Radiolyse von Fetten entstehen (DIN EN 1784:2003 – 11), mittels Gaschromatographie (GC), oder die Bestimmung von 2-Alkylcyclobutanonen mittels GC-MS nach Soxleth-Extraktion der homogenisierten Proben (DIN EN 1785 : 2003 – 11). Alkylcyclobutanone, die aus Triglyceriden entstehen wenn diese ionisierender Strahlung ausgesetzt werden, sind in unbestrahlten Lebensmitteln nicht zu finden (*unique radiolytic products*). Die Methode ist ebenfalls für alle fetthaltigen Lebensmittel geeignet.

BIOLOGISCHE METHODEN:

Biologische Nachweisverfahren sind meist nicht strahlenspezifisch und werden daher nur als allgemeine Screeningverfahren eingesetzt. Beispielsweise basiert der auf eine Vielzahl verschiedener Lebensmittel anwendbare *Comet-assay* auf strahleninduzierten, unspezifischen DNA-Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen. Man untersucht dabei aufgearbeitete Zellen mit Mikro-Gelelektrophorese und erhält typische Muster für bestrahlte Proben (DIN EN 13784 : 2002 – 04). Chromosomale DNA ist zu groß, um als Ganzes im elektrischen Feld zu wandern. Nur geschädigte DNA-Fragmente sind in der Lage aus dem Zellkern herauszuwandern, was auf dem Gel charakteristische Kometenschweif-Muster erzeugt. Quantitative Auswertung ist durch Computerprogramme möglich (Ostling & Johanson, 1984).

2.2.4 Gesetzliche Regelung in der EU und in Österreich

EUROPÄISCHE UNION:

Im Jahr 1999 wurden zwei Richtlinien erlassen, die innerhalb der Europäischen Union die Rechtsvorschriften über mit ionisierenden Strahlen behandelte Lebensmittel regeln: Beide basieren auf den 1983 von der Codex Alimentarius Commission aufgestellten Regelungen, dem *Codex General Standard for Irradiated Foods* (Codex Stan 106-1983).

1) Richtlinie 1999/2/EG des Europäischen Parlaments zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über mit ionisierenden Strahlen behandelte Lebensmittel und Lebensmittelbestandteile:

Diese Rahmenrichtlinie betrifft die Herstellung, das in Verkehr bringen und die Einfuhr von Lebensmitteln und Lebensmittelbestandteilen, die mit ionisierenden Strahlen behandelt wurden. Die Richtlinie legt fest, dass die Behandlung eines bestimmten Lebensmittelproduktes mit ionisierender Strahlung nur zugelassen werden kann, wenn sie technologisch *sinnvoll* und *notwendig*, gesundheitlich *unbedenklich* und für den Verbraucher nützlich ist und sie nicht als Ersatz für Hygiene- und Gesundheitsmaßnahmen oder für gute Herstellungs- oder Landwirtschaftsverfahren verwendet wird. Die Regelung schreibt außerdem eine Kenntlichmachung bestrahlter Produkte, sowie der damit hergestellten Lebensmittel vor. Unabhängig von der Menge der Zutat ist eine Bestrahlung immer mit der Angabe „bestrahlt“ oder „mit ionisierenden Strahlen behandelt“ kenntlich zu machen.

2) Richtlinie 1999/3/EG des Europäischen Parlaments über die Festlegung einer Liste von mit ionisierenden Strahlen behandelten Lebensmitteln und Lebensmittelbestandteilen:

Diese Durchführungsrichtlinie enthält eine so genannte *Positivliste*, in der die Lebensmittel definiert sind, die für eine Behandlung mit ionisierenden Strahlen in der *gesamten* EU zugelassen sind. Sie enthält bislang einzig getrocknete aromatische Kräuter und Gewürze mit einer maximalen durchschnittlich absorbierten Gesamtdosis

GRUNDLAGEN

von 10 kGy. Zudem hat jeder Mitgliedsstaat eigene Erlaubnisse für weitere Lebensmittel (siehe Abb. 2.2.4).

ÖSTERREICH:

Im Bundesgesetzblatt (BGB 2000), 327. Verordnung über die Behandlung von Lebensmitteln und Verzehrsprodukten mit ionisierenden Strahlen, ausgegeben am 6. Oktober 2000 sind diese Richtlinien umgesetzt.

Erwähnt seien hier noch folgende Punkte:

- ◆ Bestrahlung darf lediglich auf folgende Zwecke ausgerichtet sein:
 - Verringerung der Krankheitserreger in den Lebensmitteln
 - Verringerung des Verderbs
 - Verringerung der Verluste durch vorzeitiges Reifen, Sprossen oder Keimen
 - Befreiung der Ware von Schädlingen
- ◆ Zulässige Strahlenquellen sind: Elektronenbeschleuniger (≤ 10 MeV), die Radioisotope ^{60}Co und ^{137}Cs , sowie Röntgenstrahlungsquellen (≤ 5 MeV), die maximal erlaubte durchschnittlich absorbierte Gesamtdosis darf 10 kGy nicht überschreiten.

In Österreich darf nur die Lebensmittelgruppe „Getrocknete aromatische Kräuter und Gewürze“ mit einer durchschnittlichen absorbierten Gesamtdosis von maximal 10 kGy bestrahlt, bzw. bestrahlt importiert werden. Es sei erwähnt, dass es derzeit keine Bestrahlungsanlage für Lebensmittel in Österreich gibt.

GRUNDLAGEN

KENNZEICHNUNG:

International wurde 1972 das „Radura-Symbol“ (Abb. 2.2.3) für eine Kennzeichnung empfohlen. In der EU ist dieses nicht zugelassen. Eine Bestrahlung ist immer mit der Angabe „bestrahlt“ oder „mit ionisierenden Strahlen behandelt“ auf der Verpackung zu kennzeichnen.



Abb. 2.2.3 : Radura – Symbol zur Kennzeichnung bestrahlter Lebensmittel
(Ulmann, R.M., 1972)

Auf der nächsten Seite (Abb. 2.2.4) sind die in den Ländern der Europäischen Union zur Bestrahlung zugelassenen Lebensmittel (Stand Mai 2006) aufgelistet.

GRUNDLAGEN

	Nach EU-Richtlinie 1999 / 3 / EG in allen EU-Ländern zugelassen für:	 Kräuter und Gewürze		Nach Deutschem Recht umgesetzt in der "Lebensmittelbestrahlungsverordnung"
	Die EU-Richtlinie 1999 / 2 / EG untersagt das Inverkehrbringen von nicht mit dieser Richtlinie übereinstimmenden Erzeugnissen , ermöglicht jedoch - bis zur Einigung auf die endgültige EU-Positivliste - in den einzelnen Ländern in Übereinstimmung mit der jeweiligen national geltenden Gesetzgebung die Bestrahlung von nachfolgend aufgeführten Lebensmitteln:			
 Belgien	<div> <div>Eiklar</div> <div>Kartoffeln</div> <div>Erdbeeren</div> <div>dehydriertes Blut, Plasma, Koagulate</div> <div>Obst, Pilze, Tomaten, Rhabarber</div> <div>Zwiebeln, Knoblauch, Schalotten</div> <div>Geflügel, mechanisch gewonnenes Geflügelfleisch, Innereien von Geflügel</div> <div>Kasein, Kaseinate</div> <div>tiefegefrorene Froschschenkel</div> <div>tiefegefrorene geschälte Gamelen</div> <div>getrocknete Gemüse und Früchte</div> <div>Fische, Muscheln, Aale, Krustentiere und Weichtiere</div> <div>tiefegefrorene Gewürzkräuter</div> <div>Gemüse, Hülsenfrüchte</div> <div>Getreide, Getreideflocken und -keime für Milchprodukte</div> <div>Reismehl</div> </div>			
 Frankreich	<div> <div>Kasein, Kaseinate</div> <div>Reismehl</div> <div>Gummi arabicum</div> <div>dehydriertes Blut, Plasma, Koagulate</div> <div>Zwiebeln, Knoblauch, Schalotten</div> <div>Geflügel, mechanisch gewonnenes Geflügelfleisch, Innereien von Geflügel</div> <div>tiefegefrorene Gewürzkräuter</div> <div>getrocknete Gemüse und Früchte</div> <div>tiefegefrorene Froschschenkel</div> <div>tiefegefrorene geschälte Gamelen</div> <div>Getreideflocken und -keime für Milchprodukte</div> <div>Eiklar</div> </div>			
 Großbritannien	<div> <div>Gemüse, Hülsenfrüchte</div> <div>Obst, Pilze, Tomaten, Rhabarber</div> <div>Getreide</div> <div>Kartoffeln und Süßkartoffeln</div> <div>Geflügel</div> <div>Zwiebeln, Knoblauch, Schalotten</div> <div>Fische, Muscheln, Aale, Krustentiere und Weichtiere</div> </div>			
 Italien	<div> <div>Kartoffeln</div> <div>Zwiebeln, Knoblauch</div> </div>			
 Niederlande	<div> <div>Gummi arabicum</div> <div>Gamelen</div> <div>Eiklar</div> <div>Hülsenfrüchte</div> <div>Getreideflocken</div> <div>getrocknete Gemüse und Früchte</div> <div>tiefegefrorene Froschschenkel</div> <div>Hühnerfleisch</div> </div>			
 Polen	<div> <div>Kartoffeln</div> <div>Zwiebeln, Knoblauch</div> </div>			

Abb. 2.2.4 : In der EU zur Bestrahlung zugelassene Lebensmittel (Stand: 12.5.2006, Quelle: Poster: Lebensmittelbestrahlung; Zulassung in den Staaten der europäischen Union; Max Rubner Institut, Karlsruhe, 2006)

2.3 Photometrie

2.3.1 Absorption von Strahlung im UV und VIS-Bereich

Im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich führen Absorptionen organischer Moleküle zu Elektronenübergängen aus Orbitalen mit bindenden oder nicht-bindenden Elektronen in leere, nicht-bindende oder antibindende Orbitale, also Übergängen zwischen diskreten Energieniveaus.

Derartige Absorptionen sind von Schwingungs- und Rotationsübergängen begleitet. Für die Anregung von σ -Elektronen ist energiereichere Strahlung erforderlich als für die Anregung einsamer Elektronenpaare oder von π -Elektronen. Die Wellenlänge der Absorption ist ein Maß für den Abstand zwischen den Energieniveaus.

Man bezeichnet die Atomgruppierung, die Strahlung absorbiert und dadurch Elektronenübergänge verursacht als Chromophor. Gewöhnlich sind nur die Chromophore von praktischer Bedeutung, deren Absorptionsmaxima langwelliger als 200 nm sind. Selbst der $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang einer isolierten C=C-Doppelbindung liegt mit annähernd 190 nm noch außerhalb dieser Grenze.

Von Bedeutung sind demnach nur Chromophore konjugierter Systeme, da durch Konjugation ΔE zwischen HOMO (höchstenergetisches besetztes Molekülorbital) und LUMO (tiefstes unbesetzte Molekülorbital) sinkt, und das Absorptionsmaximum rotverschoben wird.

Die UV-VIS-Spektrophotometrie wird im Gültigkeitsbereich des Lambert-Beer'schen Gesetzes zur quantitativen Analyse angewendet.

2.3.2 Das Lambert Beer'sche Gesetz

Beim Durchgang durch ein Probemedium erfährt ein Lichtstrahl der Intensität I_0 im Vergleich zur durchgelassenen Intensität I eine Schwächung, die von mehreren Prozessen herrührt: Der Absorption durch die Analytlösung I_A , das Küvettenmaterial I_{AK} , Reflexion an der Küvettenwand I_R und Streuung I_S .

GRUNDLAGEN

Durch Messung an einer Vergleichsküvette gleicher Schichtdicke, die nur reines Lösungsmittel enthält, werden die Anteile von Streulicht, Reflexion, Küvetten- und Lösungsmittelabsorption korrigiert.

Die Absorptionsintensität kann sowohl durch die Transmission¹ T , als auch die Extinktion² E (Absorbance A) charakterisiert werden.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.3.1) \quad A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon_{\lambda} c d \quad (2.3.2)$$

$$I = I_0 e^{-\epsilon'_{\lambda} c d} \quad (2.3.3) \quad \text{oder} \quad \ln \frac{I_0}{I} = \epsilon'_{\lambda} c d \quad (2.3.4)$$

$$0 < T < 1$$

ϵ_{λ} ... dekadischer molarer Extinktionskoeffizient [$\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$]

ϵ'_{λ} ... Extinktionskoeffizient [$\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$]

$$\epsilon_{\lambda} = \log(e) \epsilon'_{\lambda} \sim 0,434 \epsilon'_{\lambda}$$

Die Extinktion ist also eine logarithmische Größe. Sie hängt von der durchstrahlten Lösungsschichtdicke d , der Wellenlänge λ und der Analytkonzentration c ab.

Bei konstanter Küvettendicke und monochromatischem Licht bestimmter Wellenlänge nimmt daher die Transmission mit steigender Analytkonzentration exponentiell ab, wobei die Extinktion linear ansteigt. Daher eignet sie sich gut zur Kalibration mit linearer Regression.

Das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt nur für verdünnte, also wenig gefärbte Lösungen. Bei höheren Konzentrationen tritt eine Sättigung ein. Das kann mehrere Ursachen haben: Störende intermolekulare Wechselwirkung zwischen geladenen Analytteilchen, Assoziationen von Analytmolekülen sowie verschobene Dissoziationsgleichgewichte und damit verbundener unterschiedlicher optischer Eigenschaften der assoziierten bzw. dissoziierten Spezies.

1) nach DIN 1349 „spektraler Reintransmissionsgrad $\tau(\lambda)$ “

2) nach DIN 1349 „spektrales Absorptionsmaß $A(\lambda)$ “

2.3.3 Apparatives

Zur Aufnahme von Absorptionsspektren d.h. der Extinktionen bei einer bestimmten Konzentration vs. Wellenlänge hat sich im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich (ca. 190 bis max. 900 nm) das Zweistrahl-Spektrometer durchgesetzt. Anders als beim Einstrahl-Spektrometer, bei dem die Absorption des reinen Lösungsmittels vor der Probe gemessen und dann rechnerisch entfernt wird, misst man in der Zweistrahl-anordnung in kurzen Abständen hintereinander immer wieder Probe und Referenz, sodass auch zeitliche Änderungen (z.B.: Erwärmung der Lösung durch den Lichtstrahl bei längeren Messungen) berücksichtigt und eliminiert werden.

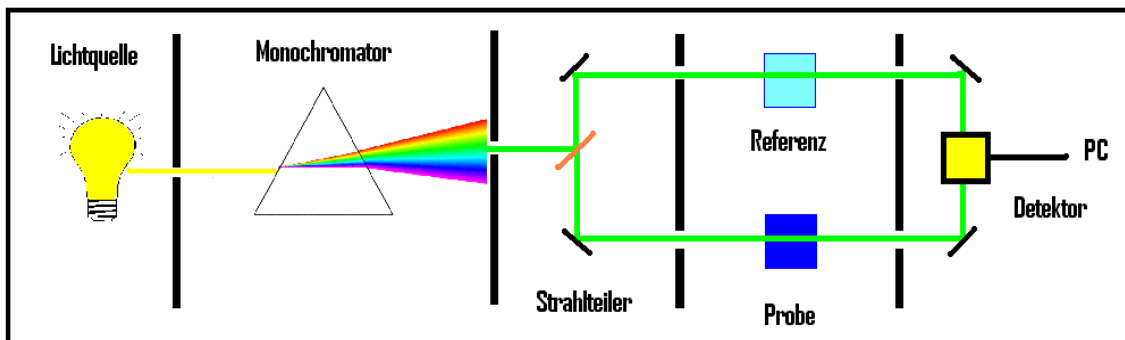


Abb. 2.3.1 : Zweistrahl-Spektralphotometer

(T.O.Nagy)

Dazu wird aus dem polychromatischen spektralen Kontinuum der Lichtquelle, in der Regel einer Wolframlampe für den sichtbaren und einer Deuteriumlampe für den ultravioletten Bereich, mit Hilfe eines Gittermonochromators ein schmales Band herausgeschnitten, wobei die Breite durch die Eintritts- und Austrittsspalte des Spektrometers bestimmt wird.

Dieser Strahl wird dann durch einen Strahlteiler durch Probe- und Referenzküvette geleitet und abwechselnd vom Detektor, in der Regel einem Photomultiplier oder einer Photodiode gemessen. Aus I und I_0 errechnet sich dann $T(\lambda)$ bzw. $A(\lambda)$.

2.4 Chromatographie

Bei der HPLC (High Performance Liquid Chromatography bzw. High Pressure Liquid Chromatography) handelt es sich um eine Form der klassischen Verteilungs-chromatographie. Die Trennwirkung beruht dabei auf der unterschiedlichen Affinität der verschiedenen Analyte zu einer stationären und einer mobilen Phase und dem daraus resultierenden Verteilungsgleichgewicht.

2.4.1 Trennprinzip in der HPLC

Die Probe, bestehend aus mehreren Verbindungen, wird in etwas mobiler Phase gelöst und auf die mit stationärer Phase gefüllte Säule aufgebracht. Es stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht zwischen den beiden Phasen ein, das idealer Weise für alle zu trennenden Substanzen verschieden ist.

Fließt kontinuierlich mobile Phase nach, so versucht sich dieses Gleichgewicht immer wieder aufs neue zwischen der stationären und frischen mobilen Phase einzustellen – die Substanzen werden nach und nach von der stationären Phase gelöst und weitertransportiert, wo sie auf frischer stationärer Phase erneut absorbiert werden und so weiter. Sie verlassen die Säule (bei vorerst konstanter Lösungsmittelzusammensetzung) zeitlich versetzt nach steigender Affinität zur stationären Phase.

2.4.2 Kenngrößen der HPLC

Man nennt die Zeit t_r , die ein Analyt im Mittel von der Injektion bis zur Detektion auf der Säule verbringt Retentionszeit (Gleichung 2.4.1), wobei L die Länge der Säule und v die Migrationsgeschwindigkeit des Analyten ist. Ein theoretisch nicht zurückgehaltener Analyt durchläuft die Säule mit der Geschwindigkeit der mobilen Phase u (Gl. 2.4.2) in der so genannten *Totzeit* t_M .

$$v = \frac{L}{t_r} \quad (2.4.1) \quad u = \frac{L}{t_M} \quad (2.4.2)$$

2.4.2.1 Trennfaktor – Selektivität

Zur Beschreibung der Trennbarkeit zweier Stoffe mit einer bestimmten chromatographischen Messanordnung dient der Trennfaktor α , auch Selektivitätsfaktor genannt. Für zwei zu trennende Stoffe A und B entspricht er genau dem Verhältnis ihrer Verteilungskoeffizienten K_A und K_B (Gl. 2.4.3).

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad (2.4.3) \quad \text{wobei für eine Substanz } i \text{ gilt: } K_i = \frac{c_S}{c_M} \quad (2.4.4)$$

Das heißt der Verteilungskoeffizient (Gl. 2.4.4) beschreibt das Konzentrationsverhältnis c_S/c_M , das sich zwischen stationärer (S) und mobiler (M) Phase einstellen würde, wenn man nicht ständig mit frischem Eluens nachspült. Da diese Größe aber aus einem Chromatogramm nicht zugänglich ist, greift man auf das Verhältnis der Kapazitätsfaktoren k' zurück, die sich über die Retentionszeiten definieren (Gl. 2.4.5 und 2.4.6).

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad (2.4.5) \quad \text{mit} \quad k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2.4.6)$$

Der Kapazitätsfaktor sollte günstigerweise zwischen 1 und 5 liegen. Ist er viel kleiner als 1, wird die Substanz zu schnell eluiert, weil sie fast mit der Geschwindigkeit der mobilen Phase wandert. Bei Werten über 5 werden die Retentionszeiten unbrauchbar lang.

2.4.2.2 Trennstufenhöhe und Trennstufenzahl

In der klassischen Theorie der Chromatographie stellt man sich die Wanderung einer Substanz durch die Säule als eine Reihe diskreter Verteilungsschritte (s.o.) vor. Nach diesem Modell stellt sich auf jeder dieser *Trennstufen* oder *theoretischen Böden* zwischen der stationären und mobilen Phase ein Gleichgewicht für die Substanz ein. Die Trennstufenzahl N hängt direkt mit der Trennstufenhöhe H und der Säulenlänge L zusammen (Gl. 2.4.7).

$$N = \frac{L}{H} \quad (2.4.7)$$

$$H = \frac{\sigma_L^2}{L} \quad (2.4.8)$$

$$H = \frac{\sigma_t^2 L}{t_L^2} \quad (2.4.9)$$

Unter der Trennstufenhöhe H oder *theoretischen Bodenhöhe* versteht man das Verhältnis der Peakvarianz (Standardabweichung σ nach Gauß zum Quadrat, in cm^2 oder s^2) des chromatographischen Peaks einer Substanz zu ihrer Laufstrecke L (Gl. 2.4.8), oder Laufzeit t_L (Gl. 2.4.9). H (und damit N) sind also direkt aus dem Chromatogramm zugänglich. H ist ein Maß für die *Säuleneffizienz* – je kleiner H ist, desto höher ist die erzielbare Auflösung. Da es sich bei den Größen H und N um *theoretische* Vergleichsgrößen handelt, (in Wirklichkeit stellt sich nie ein entsprechendes Gleichgewicht ein) sollte beim Vergleich der Trenneffizienz verschiedener Säulen stets die gleiche Messmethode und Vergleichssubstanz verwendet werden.

2.4.2.3 Trennleistung – Van Deemter Gleichung

Die Trennstufenhöhe H ist eine Funktion der *linearen Strömungsgeschwindigkeit* \bar{u} der mobilen Phase in cm/s . Sie besitzt ein Minimum (siehe Abb. 2.4.1) bei der optimalen Strömungsgeschwindigkeit. Diese experimentell messbare Kurve kann durch die van Deemter Gleichung (2.4.10) mathematisch angenähert werden. Sie setzt sich aus drei Termen zusammen. A beschreibt die *Eddy-Diffusion* (auch Kornumströmung oder Wirbeldiffusion, abhängig von der Partikelgröße), B die longitudinale Diffusion, eine Funktion der Viskosität und Temperatur der mobilen Phase (als einziger Term

GRUNDLAGEN

unabhängig von der stationären Phase), und C den Massenübergang zwischen den beiden Phasen (ebenfalls eine Funktion der Partikelgröße, ihrer Porosität, der Dimension der Säule und des Diffusionskoeffizienten der stationären Phase). In Abbildung 2.4.1 sind die Beiträge der drei Terme zur Gesamttrennstufenhöhe bei steigender Strömungsgeschwindigkeit dargestellt.

Term A ist für das verwendete System konstant, B sinkt sehr schnell mit steigender Strömungsgeschwindigkeit (bei hohen Geschwindigkeiten ist die Diffusion in Strömungsrichtung vernachlässigbar) und C steigt linear mit \bar{u} (weniger Zeit zum Massenaustausch zwischen den Phasen).

$$H = A + B/\bar{u} + C\bar{u} \quad (2.4.10) \quad \text{Die van Deemter Gleichung}$$

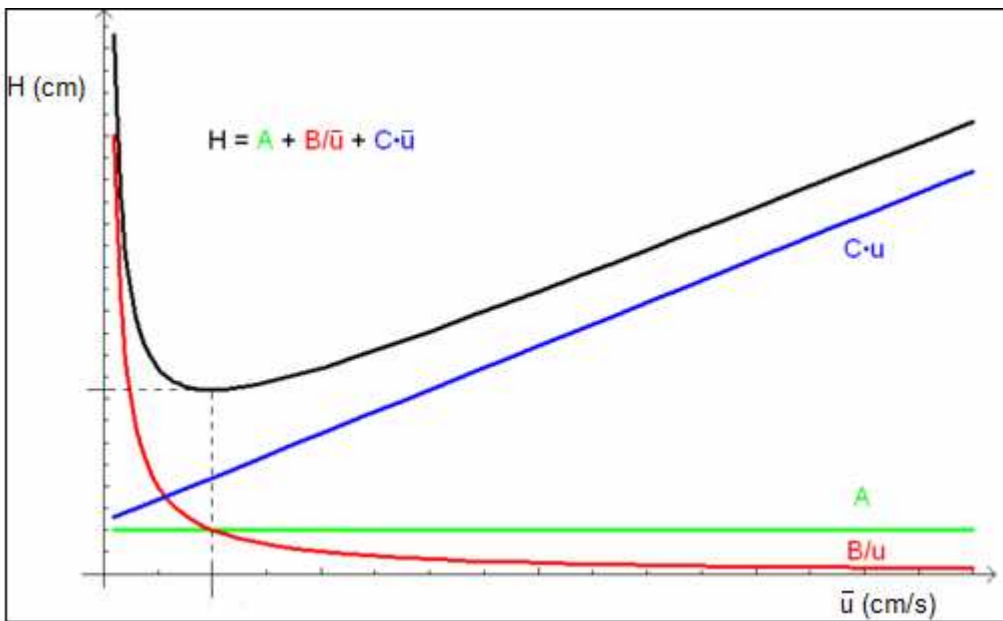


Abb. 2.4.1 : Van Deemter Diagramm und die drei beitragenden Terme

2.4.2.4 Auflösung

Die Selektivität bezüglich zweier Komponenten in einem *bestimmten Phasensystem* wird durch den Trennfaktor (Gl. 2.4.3 bzw. 2.4.5) ausgedrückt. Für eine spezielle Säule geht hier aber noch die Anzahl von Trennstufen ein, was schließlich zur Gleichung für

GRUNDLAGEN

die chromatographische Auflösung R (Gl. 2.4.11) führt. Für sehr ähnliche Kapazitätsfaktoren $k_A \sim k_B = k$ vereinfacht sie sich zu Gleichung 2.4.12.

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \frac{k'_B}{1 + k'_B} \quad (2.4.11) \quad R = \frac{\sqrt{N}}{4} (\alpha - 1) \frac{k'}{1 + k'} \quad (2.4.12)$$

Die einzelnen Einflussgrößen lassen sich zur Optimierung der Auflösung ziemlich unabhängig voneinander variieren: α und k' durch Veränderung der Temperatur (GC) oder Laufmittelzusammensetzung (LC), N über die Säulenlänge bzw. H , und H über die Strömungsgeschwindigkeit, Korngröße usw. (van Deemter Gleichung, s.o.). Bei zwei gleich großen Peaks gleicher Form spricht man bei $R=1$ von *Basislinientrennung* oder 4σ -Trennung.

2.4.3 Reversed Phase Chromatographie

Im Gegensatz zur so genannten Normalphasen- (NP) Chromatographie, wo man die Analyte auf einer polaren stationären Phase (Kieselgel) trennt und mit Laufmitteln steigender Polarität, gereiht in der so genannten *eluotropen Reihe*, eluiert, ist die stationäre Phase in der Umkehrphasenchromatographie (reversed phase, RP) unpolar. Dazu werden im einfachsten Fall Alkane mit meist 8 oder 18 Kohlenstoffen durch Reaktion von Alkylchlorsilanen mit den Silanolgruppen ans Kieselgel gebunden. Die Elutionskraft der Laufmittel steigt hier im umgekehrten Sinn nach der eluotropen Reihe von polar bis unpolar. 75% aller HPLC-Anwendungen sind heute reversed phase-Methoden.

2.4.4 Gradientenelution

Wenn sich die Zusammensetzung des Laufmittels während eines chromatographischen Laufes nicht ändert, spricht man von *isokratischer* Elution. Dabei kann es passieren, dass sich besonders bei komplexen Gemischen große Abstände zwischen der Detektion chemisch unterschiedlicher Substanzen oder Substanzgruppen ergeben, weil manche kaum zurückgehalten werden, andere aber durch die geringe Elutionskraft des

Laufmittels sehr lange auf der Säule verbleiben, und damit den Lauf unnötig verlängern. Bei der Gradientenelution wird nun die Laufmittelzusammensetzung kontinuierlich oder in Stufen verändert, in der RP-Chromatographie beispielsweise wird die Elutionskraft durch einen höheren Anteil Methanol gesteigert, so dass sich die Analysenzeit verkürzt und die Peaks über das ganze Chromatogramm mit ähnlicher Präzision auswertbar werden.

2.4.5 Detektion und Quantifizierung

Zur Detektion eluierender Substanzen kann man entweder die Veränderung einer physikalischen Messgröße der mobilen Phase messen, oder gezielt einzelne Analyte aufgrund ihrer physikalischen oder chemischen Wechselwirkung mit dem Detektor suchen. Zu ersteren zählen die Messung des Brechungsindex über eine Messzelle (1-10 μl , um die Peakverbreiterung klein zu halten) mit Glasprisma oder die Messung der Leitfähigkeit für ionische Spezies (besonders in der Ionenaustauschchromatographie). Zur Bestimmung oxidierbarer oder reduzierbarer Analyte eignen sich elektrochemische (amperometrische bzw. coulometrische) Detektoren. Analyte, die Chromophore oder Fluorophore aufweisen können photometrisch nach Lambert-Beer (Kapitel 2.3) im UV oder sichtbaren Spektralbereich detektiert werden, wobei die Fluoreszenzdetektion um etwa 3 Größenordnungen empfindlicher ist als die photometrische Detektion. Zur schnellen Detektion der Spektren wird das (Fluoreszenz-) Licht oft mittels Diodenarray-Detektor (DAD) analysiert (Abb. 2.4.2). Dabei wird der Strahl durch einen Gittermonochromator in räumlich getrennte Strahlbereiche in Form von Kreissektoren aufgetrennt, deren Intensität von im Halbkreis angeordneten Fotodioden gemessen wird. Die spektrale Auflösung eines DAD hängt von der Anzahl der Dioden ab, die im Halbkreis Platz finden und ist heute dank integrierter Silizium-Schaltkreise vergleichbar mit scannenden Spektrophotometern. Den größten Informationsgehalt über unbekannte Analyte liefert die Kopplung mit einem Massenspektrometer (Kapitel 2.5).

Zur Quantifizierung werden Standardverdünnungsreihen der einzelnen Analyte hergestellt und mit derselben Methode wie die Probe gemessen. Bei sehr schmalen Peaks liefert schon die Auswertung über die Peakhöhe vs. Analytkonzentration eine

passable Eichgerade, meist wird jedoch die Peakfläche als Integral der Messkurve ab einer Basislinie gegen die Konzentration des entsprechenden Standards aufgetragen.

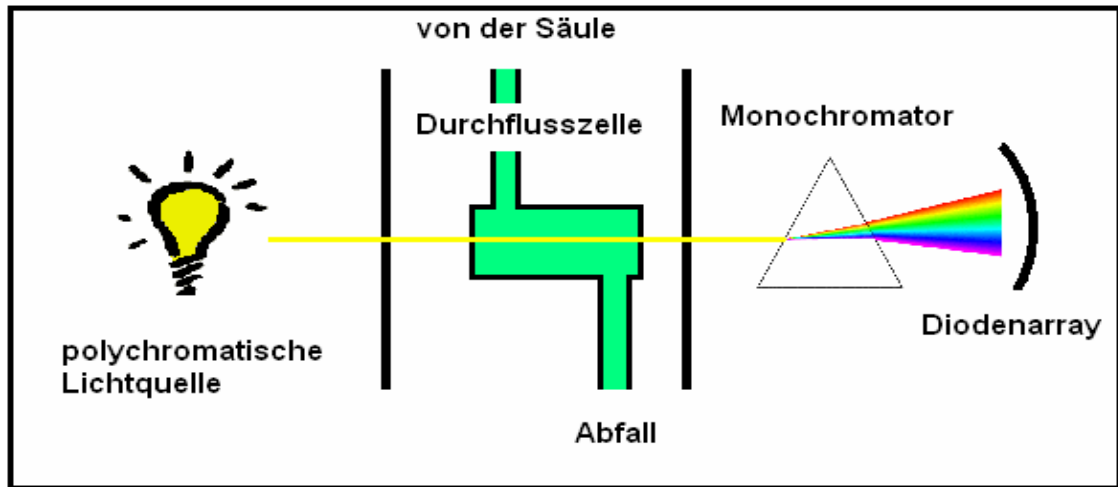


Abb. 2.4.2 : Schematischer Aufbau eines Diodenarraydetektors für die HPLC (T.O.Nagy)

2.5 Massenspektrometrie

2.5.1 Prinzip der massensensitiven Detektion

Im Massenspektrometer wird aus einer Substanzprobe ein Strahl gasförmiger Ionen gebildet und diese nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis m/z getrennt. Das Ergebnis ist ein so genanntes Massenspektrum, in dem die relativen Mengen gebildeter Ionen gegen ihr m/z Verhältnis aufgetragen sind. Da man bei der Ionisation fast ausschließlich einfach geladene Ionen erzeugen kann, entspricht das dann der Massenverteilung der Atome/Moleküle in der Probe.

Prinzipiell besteht ein Massenspektrometer aus

- a) Einlasssystem, b) Ionenquelle, c) Analysator, d) Detektor

wobei a) und b) oft in einem Bauteil vereint sind. Die gebildeten Ionen werden im elektrischen Feld beschleunigt, im Analysator getrennt und gelangen dann selektiv, meist zeitlich oder räumlich getrennt auf den Detektor (in der Regel einem Sekundärelektronenvervielfacher), der ein elektrisches Signal an die Verstärkereinheit liefert. Um eine möglichst freie Flugbahn der Ionen zu gewährleisten, steht das Gerät unter Ultrahochvakuum.

GRUNDLAGEN

Oft werden mehrere Analysatoreinheiten hintereinander geschaltet, um die Selektivität für bestimmte Ionen zu erhöhen oder mit einem Gerät einen größeren Massenbereich abzudecken. Meist geschieht das aber, um Ionen zu selektieren, dann gezielt zu fragmentieren und schließlich die Fragmente zu detektieren (MS^n).

Hier sollen nur die Analysatoren und die Kopplungsmethode mit der Chromatographieeinheit besprochen werden, die im Gerät für die Gewürzuntersuchungen für diese Arbeit enthalten sind.

2.5.2 Quadrupol – Massenfilter

Der am häufigsten eingesetzte Analysator ist der Quadrupol-Massenfilter. Er besteht aus jeweils zwei gegenüberliegenden positiv- bzw. negativ geladenen stabförmigen Elektroden (Abb. 2.5.1). Zusätzlich zu dieser Gleichspannung wird noch jeweils eine Wechselspannung einer bestimmten Frequenz überlagert. Die Ionentrennung erfolgt durch Ablenkung mit Hilfe dieser Felder: So werden zum Beispiel positive Ionen während der positiven Phase zur Mittelachse hin beschleunigt und während der negativen Phase zu den Stäben. Das Ausmaß dieser Ablenkung hängt nun von der Frequenz dieser Wechselspannung, ihrer Größe, und der Masse (Trägheit) der Ionen ab. Die überlagerte positive Gleichspannung drängt die Ionen generell auf die Mittelachse. Je leichter nun ein Ion ist, desto leichter kann es durch die Wechselfelder von seiner stabilen Bahn abgelenkt werden, wobei es an die Stäbe prallt und entladen wird. Das schränkt den Massenbereich nach unten ein. Gleichzeitig wird an die anderen beiden Stäbe eine um 180° phasenverschobene Wechselspannung angelegt. Die negative Gleichspannung bewirkt eine generelle Ablenkung von Ionen ab einer bestimmten Masse zu den Stäben, während leichtere Ionen durch die Wechselspannung in der sicheren Mitte gehalten werden können. Das schränkt den Massenbereich wiederum nach oben ein. So können nur Ionen mit einem bestimmten m/z Verhältnis den Massenfilter passieren und den Detektor erreichen.

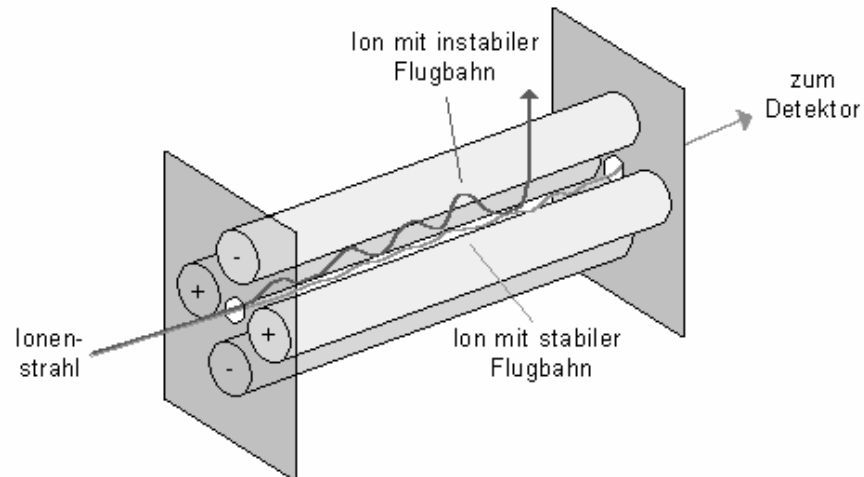


Abb. 2.5.1 : Quadrupol Massenfilter

Aus **“Teach/Me - Instrumentelle Analytik“**

Lohninger, H., Fröhlich, J., Mizaikoff, B., Rosenberg, E. 2003, CD-ROM, ISBN: 978-3-540-14957-6

Die sehr schnell arbeitenden Massensfilter werden häufig in mehreren Stufen hintereinander eingesetzt (MS^n): Zum Beispiel kann man mit drei Quadrupolen a) zuerst eine Ionenart mit bestimmter Masse selektieren, b) im zweiten Quadrupol durch gezielte Stöße mit Edelgas fragmentieren und c) im dritten Quadrupol die gebildeten Fragmente analysieren. Das funktioniert schnell genug, um mit jeder Trennmethode (GC, LC) gekoppelt zu werden.

2.5.3 Time Of Flight – Analysator

Das Flugzeit-Massenspektrometer arbeitet gepulst - das heißt die Ionen werden durch schlagartiges Einschalten eines elektrischen Feldes von der Ionenquelle bzw. dem Austrittspalt des vorgeschalteten Massenanalysators wegbeschleunigt. In der Regel passiert das im rechten Winkel zur vorherigen Flugrichtung der Teilchen, um keine ungeladenen Partikel ins Flugrohr zu bekommen. Nach der Beschleunigung durchfliegen die Ionen eine feldfreie Flugstrecke definierter Länge im Vakuum, wobei nach

$$\frac{m}{e} = \frac{2Ut^2}{s^2} \quad (2.5.1)$$

GRUNDLAGEN

leichtere Ionen früher den Detektor erreichen als schwere, da anfangs alle Ionen die gleiche kinetische Energie besitzen. Hier ist t die Flugzeit, s die Länge des Flugrohres, U die Beschleunigungsspannung, m die Masse und e die Elementarladung mit entgegengesetztem Vorzeichen.

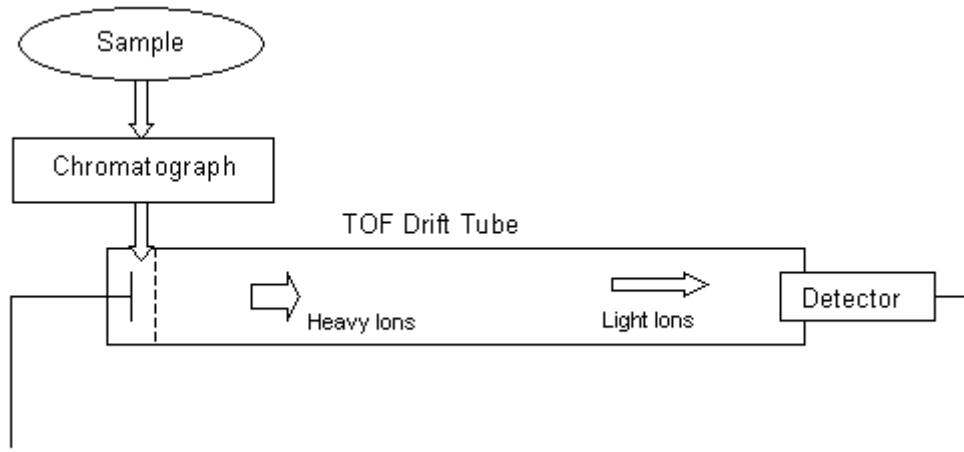


Abb. 2.5.2 : TOF-Analysator

Advanced Measurement Technology, Fa. ORTEC, (www.signalrecovery.com/ms/)

Eine weitere Verbesserung dieses Analysatortyps ist der Reflektor-TOF-Analysator, bei dem die Flugstrecke durch einen Ionenspiegel, das heißt die Reflexion des Ionenstrahls in einem entgegengesetzt geladenem elektrischen Feld verdoppelt wird. Das erhöht nicht nur die Genauigkeit der Massenauflösung aufgrund einer längeren Flugstrecke, sondern bewirkt zusätzlich auch eine weitere Fokussierung, die die Varianz in der Geschwindigkeit der Ionen aufgrund des Doppler-Effekts (wegen anfänglich thermischer Geschwindigkeitsverteilung in der Ionenquelle) minimiert. Das entspricht damit einer Korrektur der Energiedispersion.

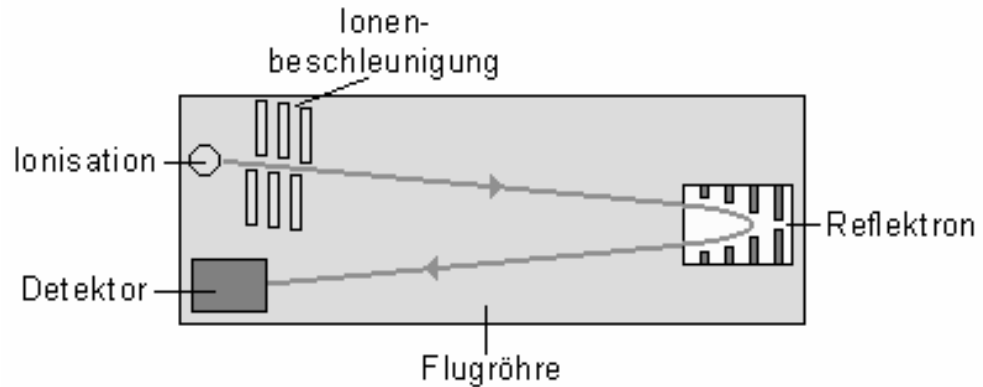


Abb. 2.5.3 : Reflektor-TOF

Aus **“Teach/Me - Instrumentelle Analytik“**

Lohninger, H., Fröhlich, J., Mizaikoff, B., Rosenberg, E. 2003, CD-ROM, ISBN: 978-3-540-14957-6

2.5.4 ESI – Kopplung mit der HPLC

Wie bei allen Sprayverfahren werden die Ionen dadurch gebildet, dass das flüssige Eluat mit Inertgas (Stickstoff, Argon, Helium) zu einem feinen Nebel zerstäubt wird, sodass Lösungsmittelmoleküle aus den Tröpfchen verdunsten und diese immer kleiner werden. Dabei sammeln sich entweder positiv oder negativ geladene Teilchen im Überschuss in ihnen an bis die Oberflächenladungsdichte einen Grenzwert erreicht und es durch Ladungsabstoßung zum Austritt von Ionen kommt.

Beim Elektrospray kann man durch Anlegen einer Hochspannung an die metallische Zerstäuberkapillare entscheiden, ob positive oder negative Ionen entstehen sollen. Typischerweise werden Quasimolekül-Ionen detektiert ($[M+H]^+$ bei positiver Spannung, $[M-H]^-$ bei negativer Spannung an der Zerstäuberkapillare).

Diese werden dann durch die Ionenoptik des Massenspektrometers selektiv abgezogen und getrennt.

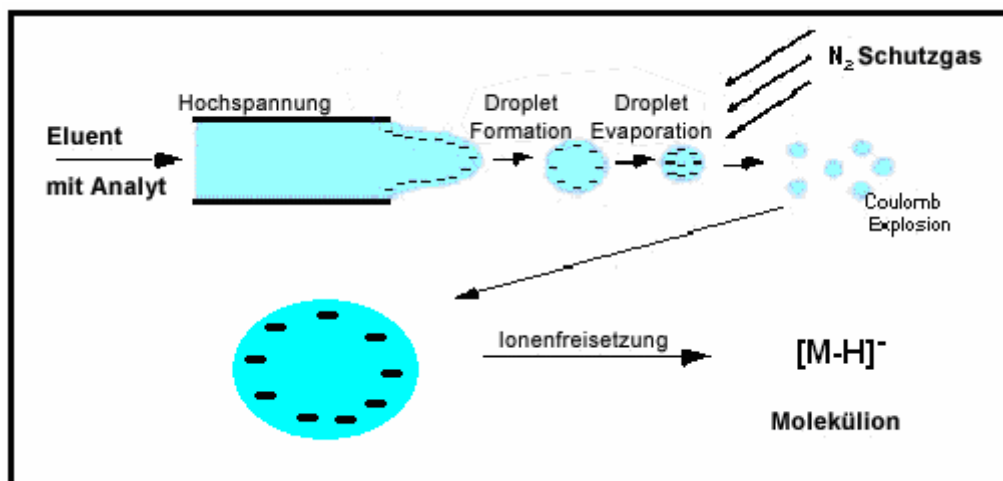


Abb. 2.5.4 : ESI. (T.O.Nagy)

Ursprüngliche Version aus: Ionisierungstechniken in der Massenspektrometrie - von der ESI bis zur API, *Lebensmittelchemisches Institut des Bundesverbandes der Deutschen Süßwarenindustrie* (www.lci-koeln.de)

2.5.5 Selected Ion Monitoring

Wenn man nur ein oder mehrere bestimmte Analytmoleküle bekannter Masse während eines chromatographischen Laufes verfolgen will, kann man den Massenanalysator so einstellen, dass nicht mehr alle Ionen und ihr relatives Verhältnis gescannt werden, sondern nur noch bestimmte Ionen den Detektor erreichen. Das macht das Chromatogramm übersichtlicher und ermöglicht die gezielte Suche nach Substanzen, auch wenn diese nur in geringen Mengen vorkommen und gleichzeitig mit Hauptkomponenten eluieren.

Bei modernen Geräten mit hoher Scanrate werden immer ganze Massenspektren aufgenommen und die einzelnen Ionenspuren dann aus dem Totalionenstrom herausgerechnet.

3 EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Materialien

3.1.1 Gewürze

Es wurden sowohl getrocknete als auch frische Gewürze untersucht. Die bereits getrockneten Gewürzproben wurden bei der Firma Kottas (Kottas-Heldenberg, Mag. Pharm. & Sohn, Freyung 7, 1010 Wien) gekauft und stammten aus natürlichem Anbau.

OREGANO: *Folium Oregano Cretici* aus der Türkei

THYMIAN: *Folium Salviae Officinalis* aus Albanien

SALBEI: *Folium Thymi* aus Polen

Die frischen Gewürzproben stammten aus dem heimischen Garten in Kärnten, wo sie ohne Dünge- und Schädlingsbekämpfungsmittel gewachsen sind. Sie wurden direkt nach der Ernte verschickt und innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet. Außer Oregano, Thymian und Salbei wurde hier noch zusätzlich Rosmarin zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von höchster verfügbarer Reinheit (Tabelle 3.1.1). Die Reinheit der Referenzsubstanzen für die Gesamtphenolbestimmung, die Bestimmung der antioxidativen Aktivität, sowie der Standardverdünnungsreihen wurden regelmäßig durch HPLC überprüft.

Die Verdünnungen wurden alle mit entionisiertem Wasser (Direct-Q UV 3, Fa. Millipore) durchgeführt.

EXPERIMENTE

2,2-Azinobisethylbenzo-thiazolin-6-sulphonsäure (ABTS)	Fluka
6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylsäure (Trolox)	Fluka
Ameisensäure	Fluka
Methanol, HPLC-grade	Roth
Wasserstoffperoxyd, 30 % Lsg.	Fluka
Natriumbicarbonat, wasserfrei	Roth
Gallussäure (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure)	Aldrich
Catechin (Flavan-3-ol)	Roth
Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure)	Sigma
p-Cumarsäure (4-Hydroxyzimtsäure)	Sigma
Rosmarinsäure (2-O-Coffeoyl-2-hydroxy-2,3-dihydrokaffeesäure)	Aldrich
Thymol (2-Isopropyl-5-methyl-phenol)	Sigma-Aldrich
Carvacrol (5-Isopropyl-2-methyl-phenol)	Aldrich
Kämpferol (3,5,7,4'-Tetrahydroxyflavon)	Roth
Luteolin (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavon)	Roth
Naringenin (4',5,7-Trihydroxyflavanon)	Roth
Apigenin (4',5,7-Trihydroxyflavon)	Roth
Vanillinsäure (4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure)	Aldrich
Protocatechusäure (3,4-Dihydroxybenzoesäure)	Merck
Protocatechualdehyd (3,4-Dihydroxybenzaldehyd)	Merck

Tabelle 3.1.1 : Verwendete Chemikalien

3.2 Bestrahlung und Aufarbeitung der Gewürzproben

Von allen vorhandenen Gewürzen wurde ein Teil, ca. 5 g, in verschlossenen Glasgefäßen mit der in der EU für Gewürze maximal erlaubten Dosis von 10 kGy bestrahlt. Ein weiterer Teil wurde unbestrahlt weiterverarbeitet und diente als Referenz. Die frischen Gewürze aus dem Gartenanbau in Kärnten wurden zuvor mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen und danach für einen Tag bei 105 °C vollständig getrocknet.

Die Extraktion der Gewürzproben wurde stets mit Methanol / Wasser (80:20, v:v) bei Raumtemperatur durchgeführt. Dazu wurden jeweils 2 Gramm trockenes Gewürz mit 50 ml Lösungsmittel versetzt und in geschlossenen Gefäßen 3 Tage mit 250 Umdrehungen pro Minute gerührt. Nach der Extraktion wurde die Lösung filtriert und in verschlossenen Gefäßen im Kühlschrank gelagert.

EXPERIMENTE

Folgende Extraktionen wurden durchgeführt und zur Messung verwendet:

1. Bei den Trockengewürzen der Fa. Kottas wurden von der unbestrahlten und der bestrahlten Probe je zwei Extraktionen durchgeführt, in der Folge als *Extrakt 1* und *Extrakt 2* bezeichnet.
2. Bei den getrockneten Frischgewürzen aus Kärnten wurden die unbestrahlte und die bestrahlte Probe einmal extrahiert, die Extrakte sind als *Extrakt GF* bezeichnet.

3.3 Geräte und Analysenmethoden

3.3.1 Strahlenquelle

Die Bestrahlungen wurden in einer ^{60}Co -Strahlenquelle (Gammacell 220 von NORDION International Inc., Kanata, ON, Kanada, Abb. 3.3.1) durchgeführt. Die Aktivität zum Bestrahlungszeitpunkt im Mai 2007 betrug 3277 Ci. Die Dosisleistung betrug 38,4 Gy/min, was für eine Dosis von 10 kGy eine Bestrahlungszeit von 284 min (4 h, 44 min) ergibt.

3.3.2 Spektrophotometer

Alle TEAC und Totalphenolbestimmungen wurden an einem Perkin Elmer Lambda 650 Zweistrahl-Spektralphotometer durchgeführt.

EXPERIMENTE

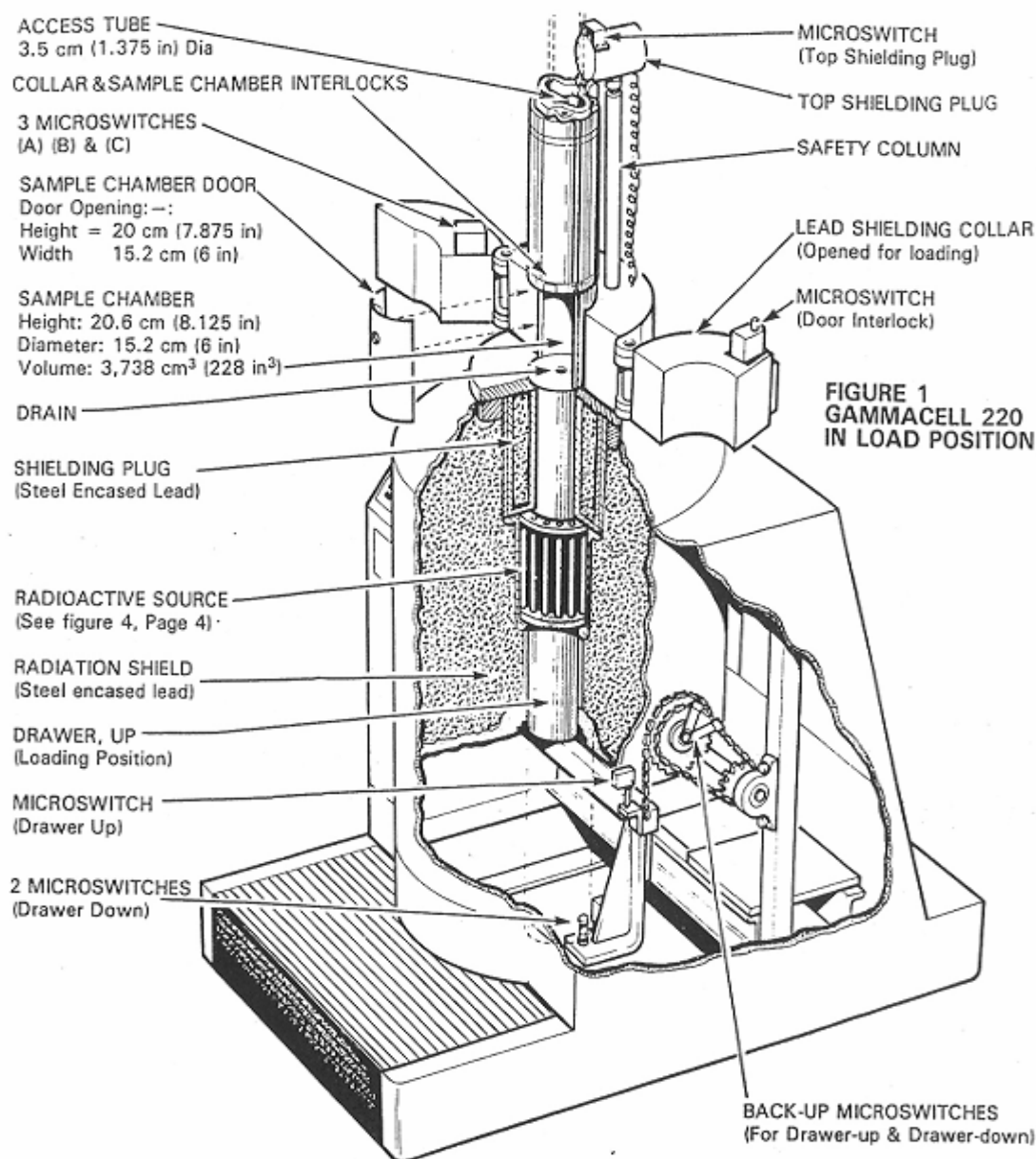


Abb. 3.3.1 : ^{60}Co -Strahlenquelle Gammacell 220
(© NORDION International Inc., Kanata, Ontario, Kanada.)

3.3.3 HPLC-DAD

Für alle HPLC Untersuchungen an den Gewürzproben wurde der gleiche Versuchsaufbau und die gleiche Säule verwendet: Ein HPLC Gerät der HP 1100 Serie von Hewlett Packard mit Entgaser, Mehrkanal-Mischpumpe für 4 verschiedene Laufmittel, Autosampler und Säulenthermostaat sowie einem Diodenarray-Detektor der Serie 1050.

EXPERIMENTE

Als Trennsäule diente dabei eine Hypersil ODS mit 5 µm Partikelgröße, 250 x 4 mm von Agilent mit einer 4 x 4 mm Vorsäule mit analoger Füllung.

Alle Untersuchungen wurden bei einer Säulentemperatur von 25 °C durchgeführt.

Die Laufmittel waren HPLC-grade Methanol der Firma Roth und 2,5%ige Ameisensäure, MS-grade, die stets frisch mit dreifach destilliertem Wasser zubereitet wurde.

Es wurden jeweils 20 µl Probelösung injiziert. Die Hauptdetektionswellenlänge war 280 nm, wobei aber stets die gesamten Spektren von 220 bis 450 nm aufgezeichnet wurden. Bei der Methode LC 1a wurden 3 Wellenlängen zur Auswertung verwendet: 250, 280 und 335 nm.

Zur Datenaufnahme und -bearbeitung wurde die CHEMStation® von Agilent (1990-2003) verwendet.

Insgesamt kamen bei den drei durchgeführten Untersuchungsblöcken drei verschiedene Methoden zum Einsatz, LC1, LC2 und LC1a (siehe 4.3.4).

Die erste Methode LC1 basiert auf der in der Literatur von Shan et al. (2005) beschriebenen Methode zur Analyse methanolischer Gewürzextrakte. Der Gradient wurde so verändert, dass eine möglichst effiziente Trennung der Inhaltsstoffe in kurzer Zeit zu erreichen war. Das Programm startet mit 5% Methanol und 95% verdünnter Ameisensäure (2,5%) und endet mit 100% Methanol (Details siehe Tabelle 3.3.1), bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml/min.

Nach jedem Lauf folgte ein 10 minütiger Regenerationslauf mit der Anfangslaufmittelzusammensetzung, um die Säule vor der nächsten Probeninjektion zu regenerieren.

Die Methode LC2 entspricht der Methode LC1, wobei der Gradient von ursprünglich 0,8 ml pro Minute Fließgeschwindigkeit auf 0,3 ml pro Minute verringert wurde, um die Methode auch mit einem massensensitiven Detektor verwenden zu können, der nur bis zu dieser Flussrate betrieben werden darf (siehe 4.4).

Die Methode LC1a entspricht ebenfalls der Methode LC1 (Fluss: 0,8 ml/min), wobei zusätzlich zur 10 minütigen Regeneration zwischen den Läufen nach jedem Lauf 15 min mit Anfangslaufmittelzusammensetzung gespült wurde, um die Säule für das nächste

EXPERIMENTE

Chromatogramm optimal zu regenerieren (bei Methode LC 1a wurde also insgesamt 25 Minuten gespült, siehe Abb. 3.3.4).

Laufzeit / min			Laufmittelzusammensetzung	
LC 1	LC 1a	LC 2	% Methanol	% Ameisensr.
0	0	0	5	95
5	5	14	5	95
6	6	16	30	70
29	29	75	30	70
30	30	80	40	60
49	49	130	40	60
50	50	135	55	45
69	69	180	55	45
70	70	185	100	00
95	80	215	100	00
-	81-95	-	5	95

Tab. 3.3.1 Gradientenzusammensetzungen der verwendeten mobilen Phasen

Der zeitliche Verlauf der Laufmittelzusammensetzung der drei verwendeten Methoden ist in den Abbildungen 3.3.2, 3.3.3 und 3.3.4 dargestellt. Die rote Kurve entspricht dem Methanolanteil, die blaue dem Anteil an 2,5%iger Ameisensäure, beides in Prozent.

LC 1

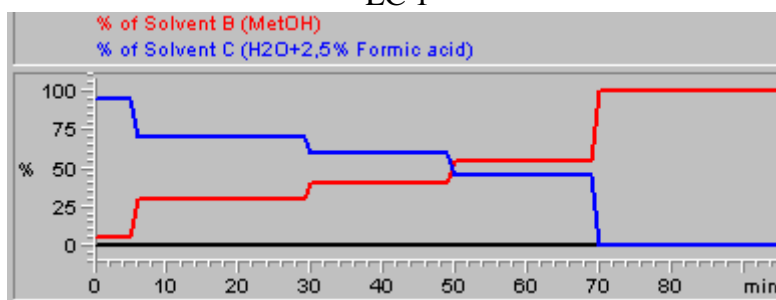


Abb. 3.3.2 Laufmittelprofile Methode LC 1 (Regeneration von 10 min zwischen den Läufen nicht dargestellt)

EXPERIMENTE

LC 2

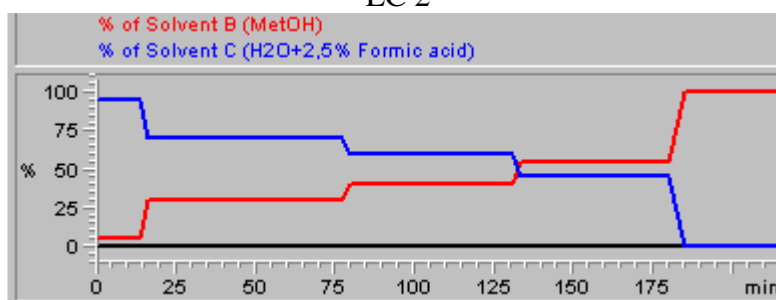


Abb. 3.3.3 Laufmittelprofile Methode LC 2

Nach jedem Lauf folgte ein 30 minütiger Regenerationslauf, bei dem die Anfangsbedingungen (5% Methanol, 95% verdünnte Ameisensäure) wieder hergestellt wurden. (im Profil nicht dargestellt)

LC 1a

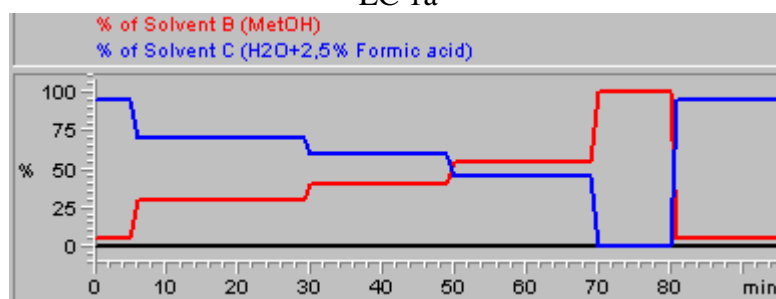


Abb. 3.3.4 Laufmittelprofile Methode LC 1a

Längere Säulenregeneration auf Anfangsbedingungen nach jedem Lauf (15 min + übliche 10 min postrun = 25 min Regeneration)

3.3.4 LC-MS

Zusätzlich zur optischen Detektion wurden die Gewürzextrakte der ersten Extraktion (Fa. Kottas) mittels LC-MS untersucht, erstens um die schon vorliegenden Ergebnisse zu bestätigen und zweitens um mehr Information über die Hauptbestandteile zu bekommen.

Es wurde dabei dieselbe Säule und Methode (LC2) verwendet, sowie ein BRUKER microTOF Massenspektrometer mit ESI-Kopplung, drei Quadrupol-Massenfiltern und einem orthogonalen Reflektor-TOF Analysator, der zur Aufnahme der Massenspektren verwendet wurde. Die Quadrupole blieben dabei für den gesamten Massenbereich offen. Dabei wurde das LC-Eluat mit 0,3 ml in der Minute bei Atmosphärendruck und 100 °C zerstäubt, (1 l/min Stickstoff) wobei im negativen Modus aufgenommen wurde, d.h. [M-H]⁻ Ionen wurden analysiert.

Pro Sekunde wurden 20 vollständige Massenspektren aufgenommen, aus denen im Nachhinein die Massenchromatogramme für die Peakintegration herausgerechnet

EXPERIMENTE

wurden. Die Integration ist hierbei eigentlich eine Summation der SEV-counts bei einer Masse über den chromatographischen Peak.

3.4 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes

3.4.1 Der Folin-Ciocalteu Test

Zur Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes wurde ein photometrischer Test mit dem Folin-Ciocalteu Reagens durchgeführt, wie er in der Arbeit von Shan et al. (2005) beschrieben ist. Im Reagens liegen komplizierte hexavalente Phosphormolybdänsäure- und Phosphorwolframsäurekomplexe folgender Zusammensetzung (Peterson, 1979) vor: $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ und $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14\text{WO}_3 \cdot 4\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

Dabei reduzieren phenolische (aber auch nicht phenolische) Substanzen in der zu untersuchenden Lösung die Komplexe im basischen Milieu durch Elektronenübertragung zu einem blauen Farbstoff (Bray & Thorpe, 1954), dessen Absorptionsspektrum ein flaches Maximum um ~760 nm aufweist. Als Referenzsubstanz hat sich Gallussäure bewährt, deshalb wird der Gesamtphenolgehalt in GAE (Gallussäureäquivalenten) angegeben.

3.4.2 Praktische Durchführung

Es wurden Eichstandards mit 100, 200, 400, 800, 1600 und 2000 mg pro Liter Gallussäure in Methanol hergestellt. Für den Test wurden dann je 0,1 ml Standard- oder Probelösung (reines Methanol für die Referenz) in ~7 ml Wasser pipettiert, 0,5 ml des Folin-Ciocalteu-Reagens hinzugefügt und geschüttelt. Nach exakt 3 Minuten (Stoppuhr) wurde die Lösung mit 1 ml gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung alkalisch gemacht und mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Folglich betrug dann die *endgültige* Konzentration in der Messlösung ein *Hundertstel* der, der Standardlösung, also 1, 2, 4, 8, 16 und 20 mg Gallussäure pro Liter. (Siehe Eichgerade, Abb. 4.1.1) Nach weiteren 60 min wurde die Extinktion gegen die Referenzlösung gemessen (Singleton & Rossi, 1965). Die Eichgerade ergibt sich aus den Extinktionswerten bei 760 nm gegen die Konzentrationen der Standardlösungen.

EXPERIMENTE

3.5 Bestimmung der antioxidativen Aktivität

3.5.1 Der Trolox-Äquivalent Test (TEAC)

Die Trolox Equivalent Antioxidative Capacity (TEAC) beschreibt die Fähigkeit der untersuchten Probe Oxidation durch reaktive Spezies zu verhindern. Der TEAC-Wert wird häufig beim Vergleich polyphenolhaltiger Proben herangezogen. Dabei erzeugt man in einer Reaktionslösung ein oxidatives Milieu und misst wie ein zugesetztes Antioxidans die Oxidationsreaktion verlangsamt (Miller et al., 1993). Der TEAC – Test kann auf viele verschiedene Arten durchgeführt werden. Ihnen allen gemeinsam ist die Messung der Geschwindigkeit einer Farbreaktion in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an Antioxidans (Kapitel 4.2.1).

Dabei vergleicht man die antioxidative Wirksamkeit der zu untersuchenden Probe mit Trolox als Referenzsubstanz. Trolox ist ein wasserlösliches Vitamin E-Derivat. Der IUPAC-Name lautet 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure. Es hat die molare Masse 250,29 und die Summenformel $C_{14}H_{18}O_4$ (Giulivi & Cadenas, 1993; siehe Abb. 3.5.1).

Als Hilfsstoff zur Messung der Reaktion wurde 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) kurz ABTS (Abb. 3.5.2) verwendet, das in oxidativer Umgebung ein stabiles blaugrün gefärbtes Radikalkation bildet, dessen Konzentration bei 734 nm gemessen wird (Miller et al., 1993).

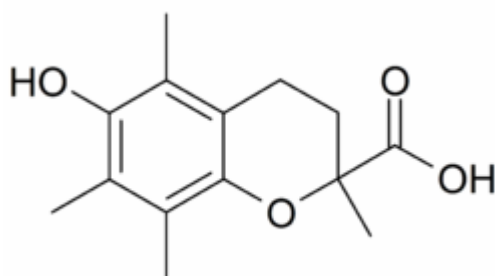


Abb. 3.5.1: Trolox Molekülstruktur

EXPERIMENTE

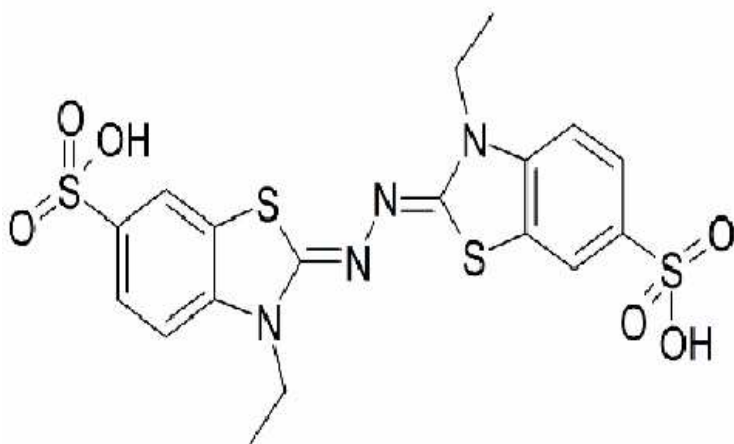


Abb. 3.5.2: ABTS Molekülstruktur

3.5.2 Praktische Durchführung

In dieser Arbeit wurden die Gewürzextrakte mittels des so genannten „Decolorization-assays“ untersucht (Re et al., 1998), da diese Methode sich bei den Vorversuchen als die genaueste und die mit den am besten reproduzierbaren Werten herausstellte (siehe Kapitel 4.2.1).

Dazu wurde das Radikalkation $\text{ABTS}^{\bullet+}$ im Vorhinein durch Zugabe von 2,45 mmol Kaliumperoxodisulfat zu 7 mmol ABTS in 50 ml entionisiertem Wasser hergestellt. Es blieb im Kühlschrank über den gesamten Messzeitraum stabil und wurde für die Messung mit entionisiertem Wasser auf 2,5% der ursprünglichen Konzentration verdünnt.

Es wurden für jede Messserie frische Eichstandards mit 0,5; 1; 1,5; 2 und 2,5 mmol/l Trolox in Ethanol hergestellt. Die methanolischen Gewürzextrakte wurden jeweils mit entionisiertem Wasser auf eine geeignete Konzentration verdünnt, um die Extinktion im empfindlichen Messbereich zu halten, wobei der Verdünnungsfaktor in der Auswertung stets berücksichtigt wurde.

Für die Messung wurden jeweils 10 μl Standard- oder Probelösung in einer Wegwerfküvette vorgelegt, 1 ml der verdünnten, 2,5%igen $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Lösung hinzugefügt und gut durchgemischt. Die Messung erfolgte nach 6 Minuten bei 734 nm gegen Wasser.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Gesamtphenolbestimmung

4.1.1 Der Folin-Ciocalteu Test

Die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes nach Folin und Ciocalteu erfolgte bei allen Gewürzen nach einer *geeigneten Verdünnung* der methanolischen Extrakte mit Wasser, um die Extinktionswerte in einem empfindlichen Messbereich zu halten. Der Test wurde dabei stets nach der modifizierten Methode von Singleton und Rossi (1965) durchgeführt, wie sie in Kapitel 3.4.2 beschrieben wurde.

4.1.2 Eichgerade

Mit Hilfe von 6 Standardverdünnungen, welche gleichzeitig mit den Probelösungen zur Reaktion angesetzt wurden und die gleich lang bei Raumtemperatur reagieren konnten, wurde im Laufe eines Tages dreimal eine Eichgerade vermessen. Die Mittelwerte der Messwerte (N=3) gegen die Konzentration der Gallussäure aufgetragen, sind in Abbildung 4.1.1 dargestellt.

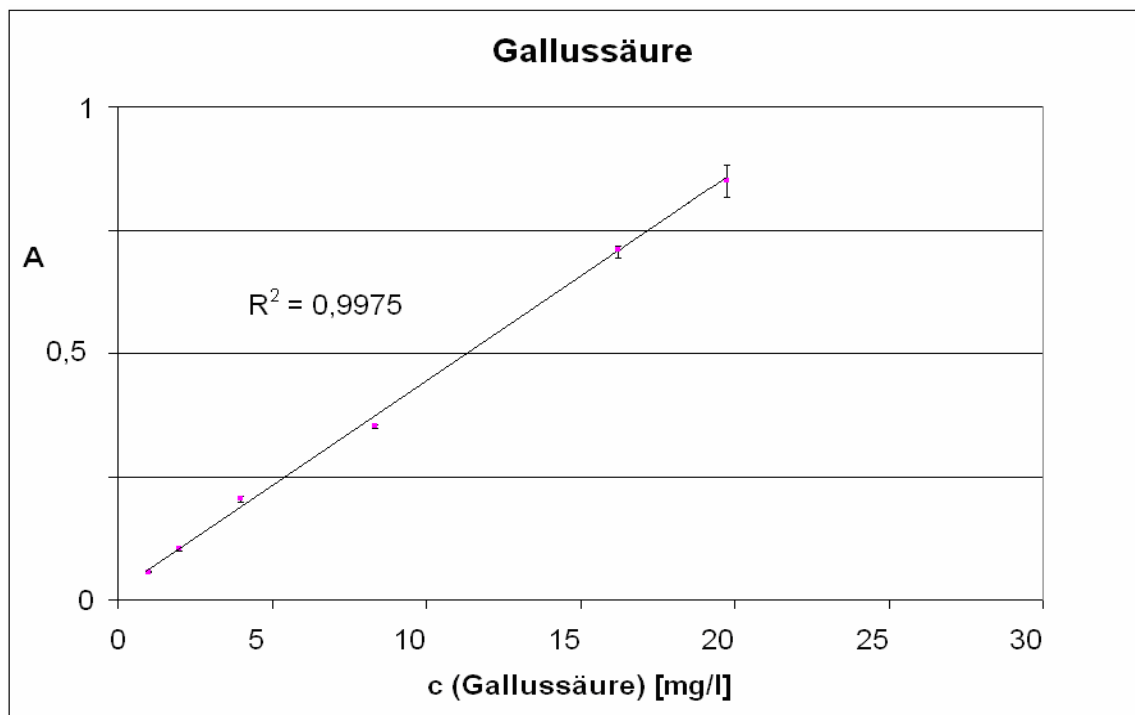


Abb. 4.1.1 : Eichgerade für Gallussäure $R^2=0,9975$ (Fehlerindikator: 1 Std.Abw.)

ERGEBNISSE

4.1.3 Totalphenolgehalt der Gewürzextrakte

Extraktion der Trockengewürze:

In der Bestimmung wurden zwei völlig identisch angesetzte Extraktionen von je 2 g der bestrahlten und unbestrahlten Gewürzproben untersucht. In Tabelle 4.1.1 sind die Mittelwerte (N=6) des Totalphenolgehaltes von jeweils zwei unbestrahlten und zwei bestrahlten Extrakten angeführt. Die Messwerte ergeben sich aus der Eichgeraden $A=k \cdot c + A_0$, wobei A die gemessene Extinktion, c die Standardkonzentration in der Messlösung und A_0 die Extinktion bei $c=0$ ist. Man erhält k als Geradensteigung und kann durch Umformen der Geradengleichung zu $c=(A-A_0)/k$ die Konzentration (mg/l Gallussäure) in der Messlösung der unbekannten Probe ermitteln. Multipliziert mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor erhält man dann die Konzentration im Extrakt und damit die GAE in g pro 100 g Trockengewicht (Tabelle 4.1.1).

	Dosis	Totalphenolgehalt (Mittelwert aus 6 Messungen)	Mittelwert des Totalphenolgehaltes (aus zwei Bestimmungen)
	kGy	GAE, g/100g TG	GAE, g/100g TG
OREGANO	0	4,64	4,51
	0	4,38	
	10	4,45	4,37
	10	4,28	
THYMIAN	0	4,45	4,57
	0	4,69	
	10	4,53	4,67
	10	4,81	
SALBEI	0	3,26*	3,61
	0	3,61	
	10	3,58	3,61
	10	3,63	

Tabelle 4.1.1 : Gesamtphenolgehalt der Trockengewürzextrakte. *Der Wert wurde als Ausreißer gewertet (vermutlich Fehler bei der Extraktion oder Verdünnung)

ERGEBNISSE

Extraktion der getrockneten Frischgewürze:

Mit derselben Messmethode wurden auch Gesamtphenolbestimmungen an den Extrakten der Gewürze aus eigenem Anbau durchgeführt, siehe Tabelle 4.1.2 (2 Einzelserien).

	Dosis	Totalphenolgehalt (Einzelmessungen)	Mittelwert des Totalphenolgehaltes (aus zwei Bestimmungen)
	kGy	GAE, g/100g TG	GAE, g/100g TG
OREGANO	0	2,75	2,74
	0	2,73	
	10	2,59	2,58
	10	2,58	
THYMIAN	0	1,91	1,95
	0	1,98	
	10	2,00	1,97
	10	1,95	
SALBEI	0	3,23	3,21
	0	3,20	
	10	3,02	3,12
	10	3,22	
ROSMARIN	0	4,24	4,26
	0	4,28	
	10	4,92	4,91
	10	4,90	

Tabelle 4.1.2 : Gesamtphenolgehalt der Gewürzextrakte von Frischgewürzen

Die Interday-Reproduzierbarkeit ermittelt am selben Extrakt innerhalb einer Woche lag unter +/- 5%. Die filtrierte Extrakte waren im Kühlschrank über Wochen stabil. Es zeigte sich keine Abnahme des Totalphenolgehaltes während des gesamten Untersuchungszeitraumes.

ERGEBNISSE

4.2 Antioxidative Kapazität

4.2.1 TEAC-Test

Ermittlung der optimalen Messmethode

Zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität der Gewürzextrakte wurden mehrere Vorgehensweisen getestet, wobei alle auf der Messung der Extinktion des $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Radikals bei 734 nm beruhen. Grundsätzlich besteht dabei die Möglichkeit, seine Bildungsgeschwindigkeit im oxidativen Milieu zu messen (Miller et al, 1993), die durch anwesende Antioxidantien abnimmt. Man kann aber auch die Geschwindigkeit der Rückbildung von ABTS aus dem vorher gebildeten Radikal in der reduzierend wirkenden Umgebung der Probelösung (Re et al., 1998), was einer Abnahme der Extinktion (Entfärbung der Probelösung) entspricht, messen, oder man kann die Extinktion nach Ende der Entfärbungsreaktion zur Auswertung verwenden.

Die ersten Versuche nach der Methode von Miller et al. (1993) führten zu keinen reproduzierbaren Ergebnissen. Die Methode beruht auf der Bildung des Radikals über die Zwischenstufe eines Metmyoglobin-Radikals aus Wasserstoffperoxid in PBS-Pufferlösung bei 37 °C. Die Reaktion wird durch die Zugabe der Wasserstoffperoxid-Lösung gestartet, und ihre Geschwindigkeit verfolgt. Zur Auswertung wurde die Extinktion nach 6 Minuten herangezogen. Schnell wirkende Antioxidantien tragen auch zur Reduktion des Metmyoglobin-Radikals bei. In der Originalarbeit wurden alle Analysen mit einem automatisierten Zentrifugalanalysator durchgeführt, die Eigenversuche waren aber aufgrund der geringen Analysenvolumina und das Fehlen eines thermostatisierbaren Photometers erfolglos.

Eine Verbesserung stellt die als „decolorization assay“ bezeichnete Methode nach Re et al. (1998) dar. Dabei verzichtet man auf die empfindliche biologische Zwischenstufe des Metmyoglobin-Radikals. Das $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Radikal wird im Vorhinein durch Oxidation von ABTS mit Kaliumperoxodisulfat gebildet. Das Oxidationsmittel wird nicht stöchiometrisch eingesetzt, so dass nur ein Teil des ABTS umgesetzt wird. Bei Zugabe von antioxidativen Substanzen kann die Geschwindigkeit der Rückreaktion, also die Abnahme der freien $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Konzentration, als Entfärbung gemessen werden.

ERGEBNISSE

4.2.2 Eichgerade

Da das Erstellen der Eichgeraden über die Reaktionsgeschwindigkeit (Steigung der Extinktion vs. Zeit – Geraden) vs. TROLOX-Konzentration, zu schlecht reproduzierbar war, um die geringen Unterschiede bei den Gewürzextrakten erkennen zu können, wurde wie in der ursprünglichen Methode die Extinktion zu einem fixen Zeitpunkt nach dem Mischen der Reagenzien mit der Probe zur Auswertung herangezogen.

Abbildung 4.2.1 zeigt den linearen Zusammenhang der Extinktion und der Konzentration des $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Radikals in wässriger Lösung. Dieser Zusammenhang war in den verdünnten Lösungen über Tage unveränderlich, was von einer außerordentlichen Stabilität des gebildeten Radikals in Lösung zeugt. Alle Tests wurden mit 2,5%iger Lösung durchgeführt ($A \sim 0,7$), wie es auch in der Arbeit von Re et al., 1998 beschrieben wird.

Da die Eichung über die Variation der TROLOX-Konzentration erfolgt, ist die genaue Konzentration der verwendeten $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Lösung *irrelevant*, solange sie bei allen Messungen die *gleiche* ist. Das Radikal liegt auf jeden Fall im Überschuss ($\sim 2,45$ mmol/l) vor und die Messlösung zeigt eine Extinktionsabnahme mit steigender TROLOX-Konzentration. In Abbildung 4.2.2 ist eine typische TROLOX-Eichfunktion (Messung 6 min nach Mischung der Reagenzien) dargestellt. Die Extinktion nimmt mit steigender Konzentration linear ab.

ERGEBNISSE

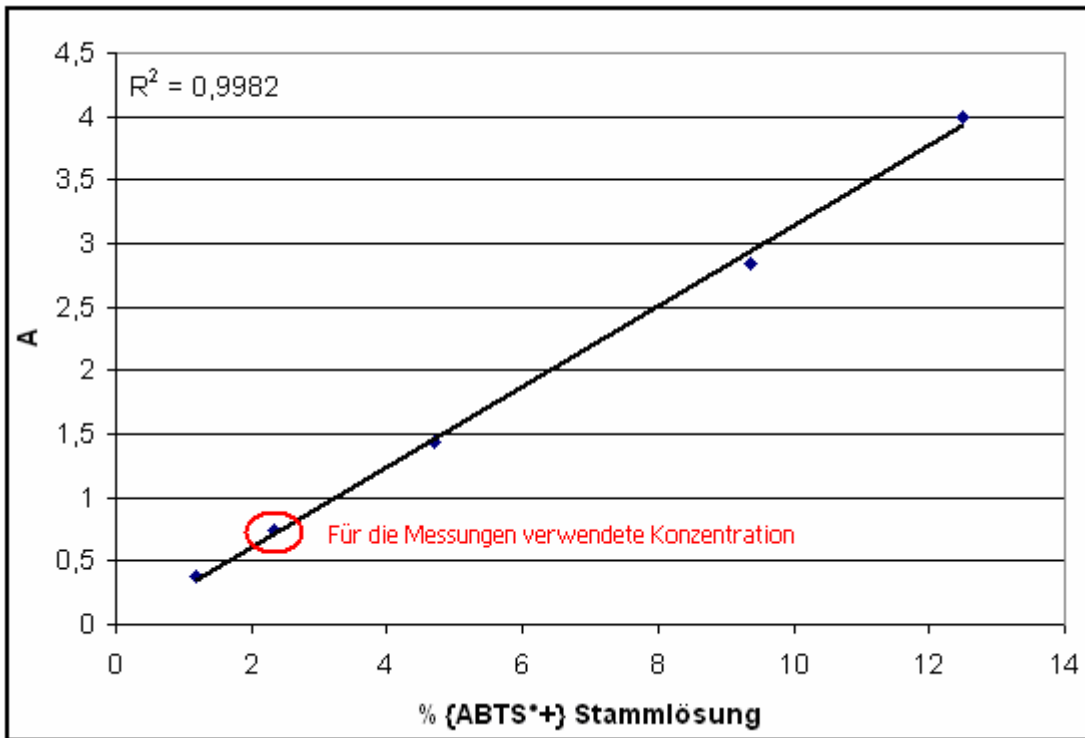


Abb. 4.2.1 : Extinktion verschiedener Verdünnungen der ABTS⁺-Stammlösung
Anmerkung: Herstellung der Stammlösung, siehe Kapitel 3.5.2

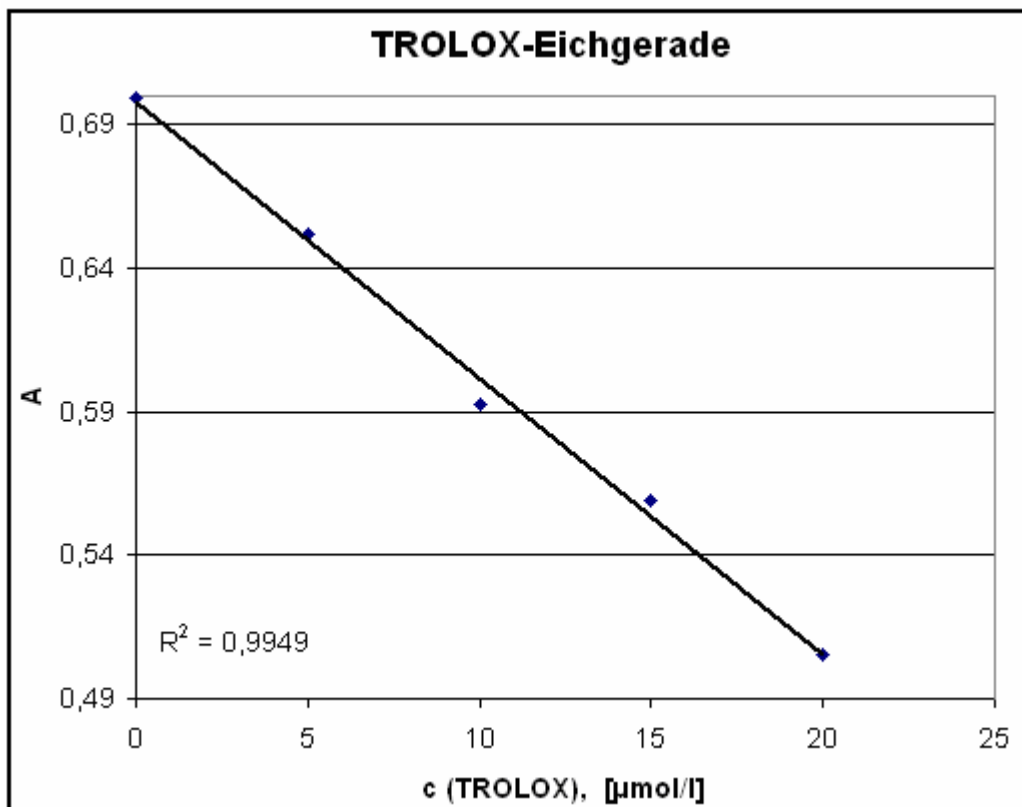


Abb. 4.2.2 : Eichgerade für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität

ERGEBNISSE

Die verwendete $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Endkonzentration in der Messlösung betrug unmittelbar nach der Mischung der 2,5%igen $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Stammlösung (1 ml) mit der jeweiligen TROLOX-Standardlösung (10 μl) $\sim 2,45 \text{ mmol/l}$ (deutlicher Überschuss).

Erklärung: aus einem $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ und zwei ABTS entstehen zwei $\text{ABTS}^{\bullet+}$ Radikalkationen.

Da $2,45 \text{ mmol K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ in 50 ml Wasser mit 7 mmol ABTS angesetzt wurden (49 bzw. 140 mmol in einem Liter), wirkt das $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ als limitierender Faktor und beschränkt die endgültige Konzentration an $\text{ABTS}^{\bullet+}$ in der Stammlösung auf 98 mmol/l. Das bedeutet die zur Messung verwendete Reagenslösung (2,5 %) hat eine $\text{ABTS}^{\bullet+}$ Konzentration von $2,45 \text{ mmol/l}$.

4.2.3 TEAC-Werte der Gewürzextrakte

Die Ergebnisse der Bestimmung (Tabelle 4.2.1) wurden aus den jeweils 2 Parallelextraktionen der Gewürze der Firma Kottas gewonnen. Es wurden die gleichen Extrakte verwendet, wie bei der Bestimmung des Totalphenolgehaltes. Es sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Einzelmessungen der unbestrahlten und bestrahlten Extrakte angegeben.

Die Messwerte ergeben sich aus der Eichgeraden $A = k \cdot c + A_0$, wobei A die gemessene Extinktion, c die Standardkonzentration in der Messlösung und A_0 die Extinktion bei $c=0$ ist. Man erhält k als Geradensteigung (in diesem Fall eine negative Zahl) und kann durch Umformen der Geradengleichung zu $c = (A - A_0) / k$ die Konzentration (TEAC in $\mu\text{mol TROLOX pro Liter}$) in der Messlösung der unbekannten Probe ermitteln. Multipliziert mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor erhält man dann die Konzentration im Extrakt und damit die TEAC in mmol TROLOX pro 100 g Trockengewicht (Tabelle 4.2.1). Aus Mangel an Probe konnten die TEAC-Werte für die Gewürze aus Kärnten nicht ermittelt werden.

ERGEBNISSE

	Dosis	TEAC (Mittelwert aus drei Messungen)	TEAC (Mittelwert der 2 Parallelextrakte)
	kGy	mmol TROLOX / 100g TG	mmol TROLOX / 100g TG
OREGANO	0	25,7	25,35
	0	25,0	
	10	25,1	24,55
	10	24,0	
THYMIAN	0	25,2	25,45
	0	25,7	
	10	25,3	25,98
	10	26,7	
SALBEI	0	19,5*	24,30
	0	24,3	
	10	22,8	23,18
	10	23,6	

Tabelle 4.2.1: TEAC-Werte. *Der Wert wurde als Ausreißer gewertet und nicht im Mittelwert der beiden Extrakte berücksichtigt.

ERGEBNISSE

Zusammenfassung und Korrelation der Gesamtphenolwerte und der TEAC-Werte

Die Gesamtphenolwerte (FC-Test) und die TEAC-Werte stimmen bei den einzelnen Trockengewürzen gut überein. Sowohl die Schwankungen innerhalb der einzelnen Extrakte (zwischen den beiden 0 kGy und 10 kGy Proben) als auch zwischen den unbestrahlten und bestrahlten Proben lagen immer unter 6%. Ein Vergleich der unbestrahlten mit den bestrahlten Trockengewürzen ergab folgende prozentuelle Änderungen: FC-Test: Oregano: -3,1%, Thymian: +2,2%, Salbei: 0%; TEAC-Test: Oregano: -3,1%, Thymian: +2,1%, Salbei -4,6%. Es kann aufgrund dieser Messergebnisse ein Einfluss der Bestrahlung ausgeschlossen werden.

Die Gesamtphenolwerte der Gewürze aus dem Gartenanbau in Kärnten (hier konnte aus Mangel an Proben kein TEAC-Test durchgeführt werden) lagen bei Oregano und Thymian deutlich, bei Salbei geringfügig tiefer, als bei jenen aus dem Handel. Dies weist auf eine andere Zusammensetzung der in 80%igem Methanol löslichen Inhaltsstoffe hin. Ein Vergleich unbestrahlter gegenüber bestrahlter GF-Proben ergab: Oregano: -5,8%, Thymian: +1%, Salbei: -2,8%, Rosmarin: +15%. Diese Ergebnisse sind mit den FC-Testwerten der Trockengewürze (Rosmarin wurde bei diesen nicht untersucht) in sehr guter Übereinstimmung.

Da sowohl die Reaktionen, die beim FC-Test, als auch jene, die beim TEAC-Test ablaufen, auf Elektronenübertragungsprozessen beruhen, können die Ergebnisse im Allgemeinen gut korreliert werden. Dies zeigt sich auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Gewürzen. Das Korrelationsdiagramm ist in Arbeit 4.2.3 dargestellt, der Korrelationskoeffizient ist 0,8226.

ERGEBNISSE

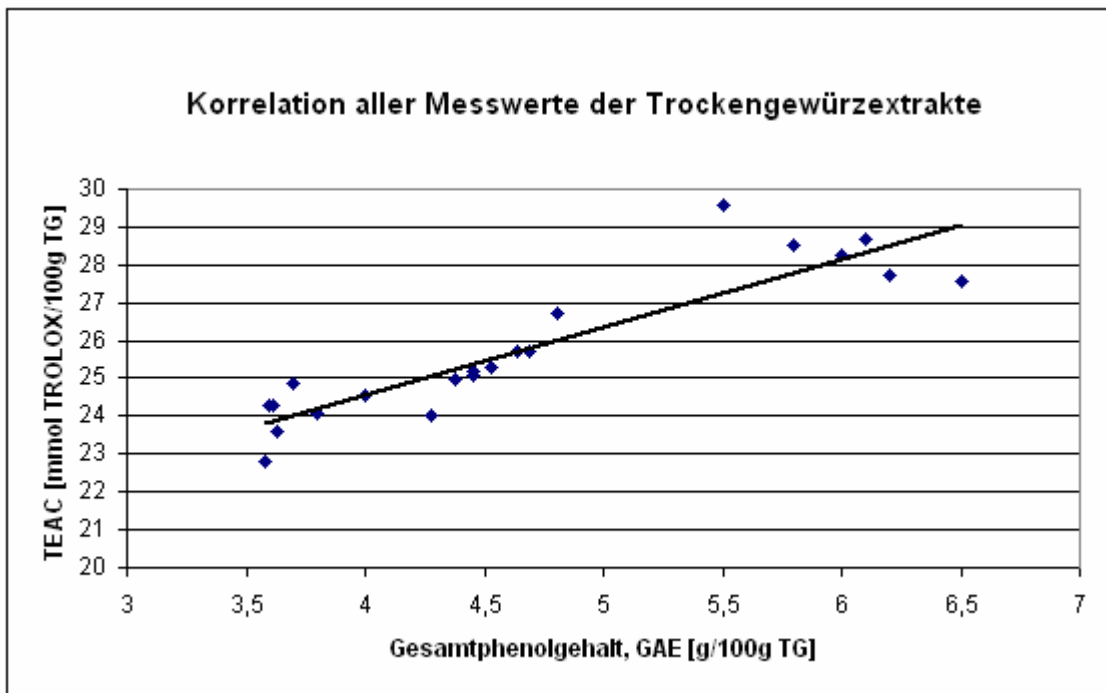


Abb. 4.2.3 : Korrelation der TEAC- und Gesamtphenol-Messungen. $R^2=0,8226$.

ERGEBNISSE

4.3 Untersuchungen von unbestrahlten und bestrahlten Gewürzen mittels HPLC

4.3.1 Literaturübersicht über Inhaltsstoffe von Oregano, Thymian und Salbei

Die Inhaltsstoffe von Gewürzen variieren in Zusammensetzung und Quantität je nach Anbauregion und klimatischen Verhältnissen (Yanishlieva, 2006). In der Alkohol löslichen Phase der Gewürze Oregano, Thymian und Salbei wurden neben Rosmarinsäure vor allem Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren, sowie deren Derivate, und verschiedene Flavonoide und deren Glucoside nachgewiesen. Einige Wesentliche sind in den Tabellen (4.3.1 bis 4.3.3) gemeinsam mit den Literaturzitaten zusammengestellt.

Die Strukturformeln der vier in allen Gewürzen gefundenen Verbindungen (Rosmarinsäure, Kaffeesäure, Apigenin, Luteolin), sowie jene von Thymol und Carvacrol sind in Abbildung 4.3.1 dargestellt:

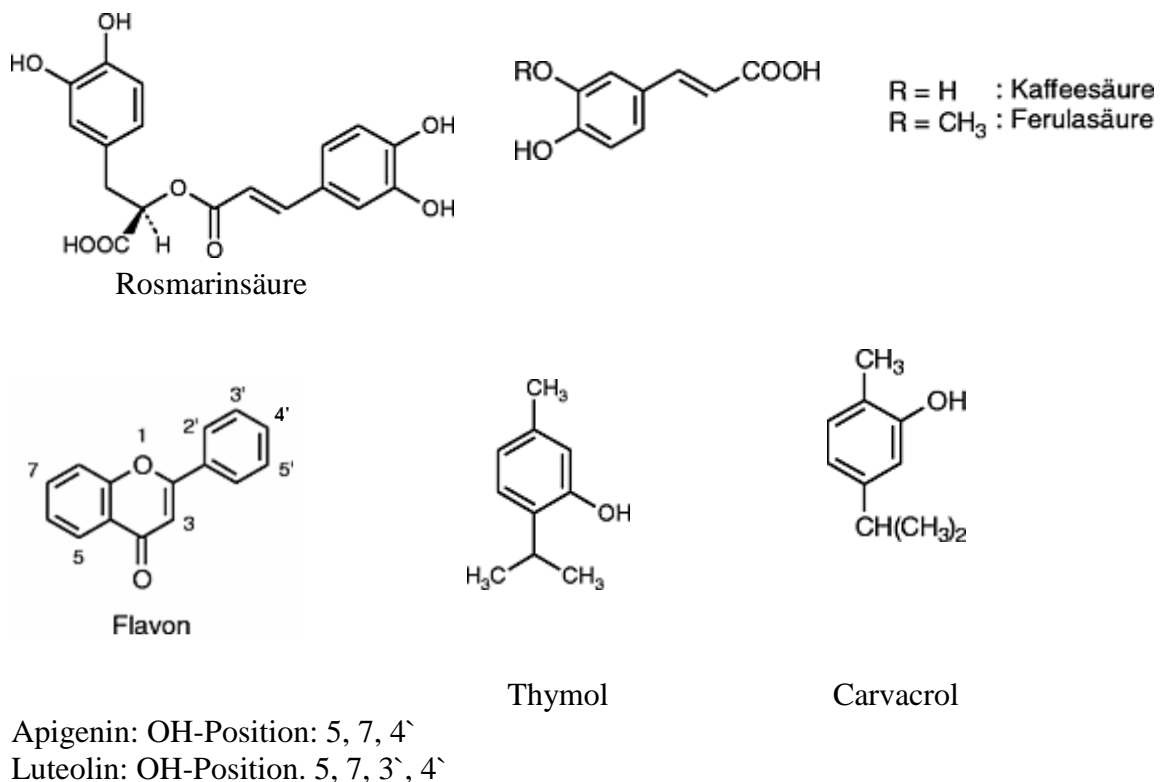


Abb. 4.3.1 : Strukturformeln wichtiger Inhaltsstoffe in den untersuchten Gewürzen

ERGEBNISSE

OREGANO - INHALTSSTOFFE / LITERATURSTELLEN

↓ Substanz / Literaturstelle→	1	2	3	4	5	6	7	8
Rosmarinsäure-Derivat			•					
Rosmarinsäure	•		•		•	•	•	
Kaffeensäure	•	•	•		•		•	
p-Cumarsäure	•							
Carvacrol	•					•		•
Vanillinsäure		•						
Apigenin				•		•	•	
Luteolin				•				
Naringenin						•		
Apigenin-Glucosid								•

Tabelle 4.3.1 : Inhaltsstoffe von Oregano und Arbeiten, die ihre Analyse behandeln:

1: Shan et al., 2005; 2: Gerothanassis et al., 1998; 3: Kikuzaki & Nakatani, 1989;
 4: Justesen & Knuthsen, 2001; 5: Fujie et al., 2003; 6: Exarchou et al., 2003; 7: Zheng & Wang, 2001; 8: Tsimogannis et al., 2006.

THYMIAN - INHALTSSTOFFE / LITERATURSTELLEN

↓ Substanz / Literaturstelle→	1	2	3	4	5	6	7	8
Rosmarinsäure	•	•						•
Kaffeensäure	•	•					•	
p-Cumarsäure	•						•	
Thymol	•		•	•		•		•
Carvacrol			•	•		•		•
Apigenin					•		•	
Luteolin	•				•		•	
Naringenin					•			
Luteolin-Glucuronid								•

Tabelle 4.3.2 : Inhaltsstoffe von Thymian und Arbeiten, die ihre Analyse behandeln:

1: Shan et al., 2005; 2: Zheng & Wang, 2001; 3: Yanishlieva, 2006; 4: Lee et al., 2005;
 5: Guillen & Manzanos, 1998; 6: Schwarz et al., 1996; 7: Proestos et al., 2005;
 8: Dapkevicius et al., 2002.

SALBEI - INHALTSSTOFFE / LITERATURSTELLEN

↓ Substanz / Literaturstelle→	1	2	3	4	5
Rosmarinsäure	•	•	•	•	
Kaffeensäure	•		•		•
p-Cumarsäure	•				
Apigenin		•	•		
Luteolin		•	•		
Luteolin-Glucosid			•	•	
Luteolin-Glucuronid				•	

Tabelle 4.3.3 : Inhaltsstoffe von Salbei und Arbeiten, die ihre Analyse behandeln:

1: Shan et al., 2005; 2: Zheng & Wang, 2001; 3: Yanishlieva, 2006; 4: Lu & Foo, 2001;
 5: Matsingou et al., 2003.

ERGEBNISSE

4.3.2 Chromatographische Trennung von Standardgemischen

Die Auswahl der Vergleichssubstanzen und die chromatographischen Bedingungen basierten hauptsächlich auf einer Arbeit von Shan et al. (2005), wobei im Laufe der Arbeit die chromatographischen Parameter so verändert wurden, dass eine optimale Trennung der Verbindungen in den Gewürzextrakten erreicht wurde. Drei Methoden, LC1, LC2 und LC1a, die in Kapitel 3.3.3 beschrieben sind, wurden eingesetzt. Die Abbildung 4.3.2 zeigt das Chromatogramm einiger Standardsubstanzen, wobei die Verbindungen unter den Bedingungen der Methode LC1 getrennt und bei 280 nm detektiert wurden.

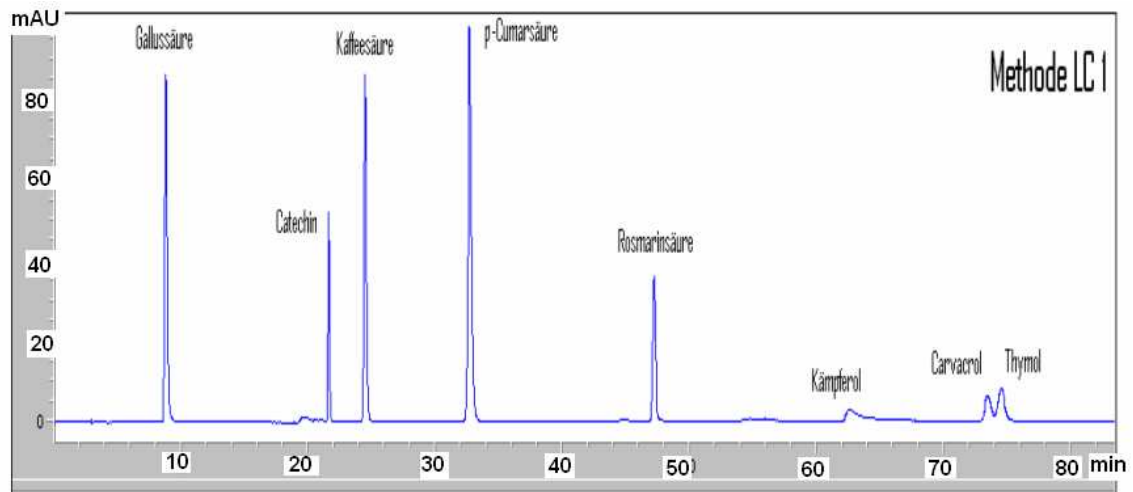


Abb. 4.3.2 : Trennung von Standardsubstanzen mit Methode LC1, λ 280 nm

Um die Linearität des Signals des UV-Detektors zu überprüfen, wurden von den 5×10^{-3} mol/l Stammlösungen von sieben Vergleichssubstanzen (s. Abb. 4.3.3) folgende Verdünnungsreihen hergestellt: 1×10^{-4} , 8×10^{-5} , 5×10^{-5} , 4×10^{-5} , 1×10^{-5} mol/l. Die Substanzen wurden mit Methode LC1 getrennt und bei 280 nm detektiert. Die Kalibrierfunktionen zeigen im untersuchten Messbereich eine ausgezeichnete Linearität und sind in Abb. 4.3.3 dargestellt.

ERGEBNISSE

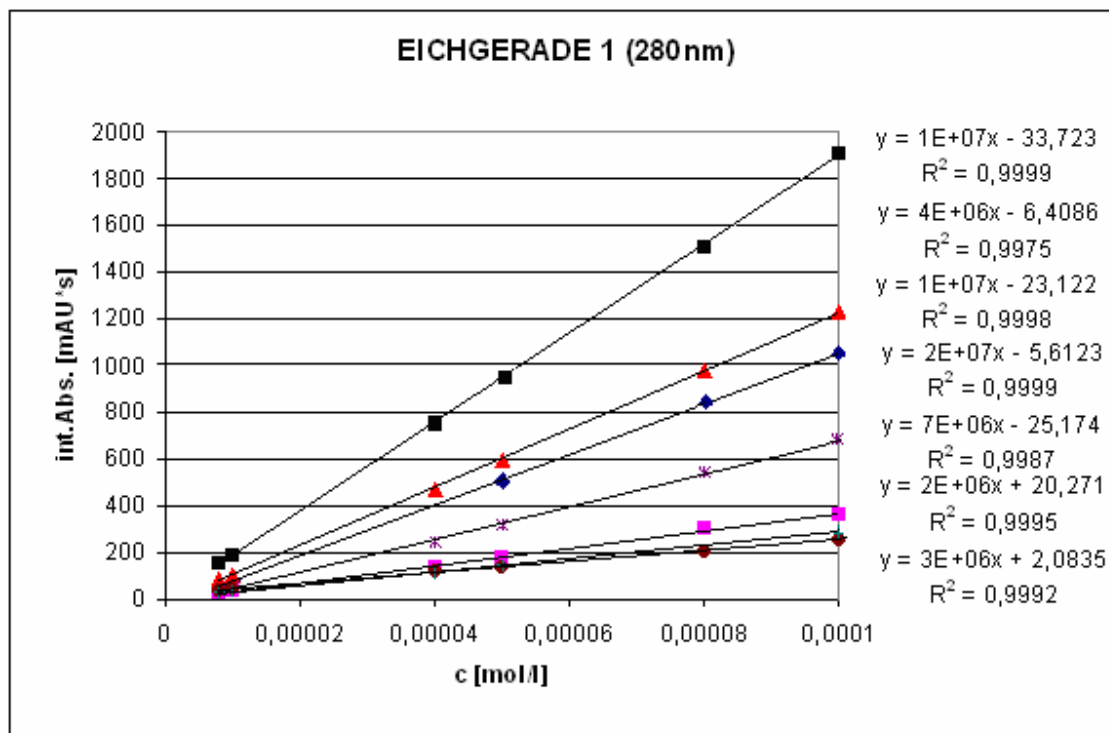


Abb. 4.3.3 : Eichgeraden und Kalibrierfunktionen. Reihenfolge von oben nach unten: Gallussäure, Catechin, Kaffeesäure, p-Cumarsäure, Rosmarinsäure, Kämpferol, Carvacrol. Thymol ist spektroskopisch ident mit Carvacrol.

Die Zahl der Standardsubstanzen wurde dann um sechs erweitert (Luteolin, Apigenin, Naringenin, Protocatechusäure, Protocatechualdehyd und Vanilinsäure), um die etwaige Gegenwart dieser Verbindungen nachweisen zu können. Zur Trennung wurde die Methode LC2 herangezogen und die Substanzen bei 280 nm detektiert. Diese Methode, deren Gradientenprofil ident ist mit dem der Methode LC1, eignete sich auch für die LC-MS Untersuchungen, da die Fließgeschwindigkeit auf 0,3 ml/min reduziert wurde. Dies wirkt sich nachteilig auf die Dauer der Analysen aus, erleichterte aber die Identifizierung der Substanzen durch LC-MS. In den Abbildungen 4.3.4 und 4.3.5 sind die Chromatogramme einiger Standardsubstanzen mit der Methode LC2 (280 nm) dargestellt.

ERGEBNISSE

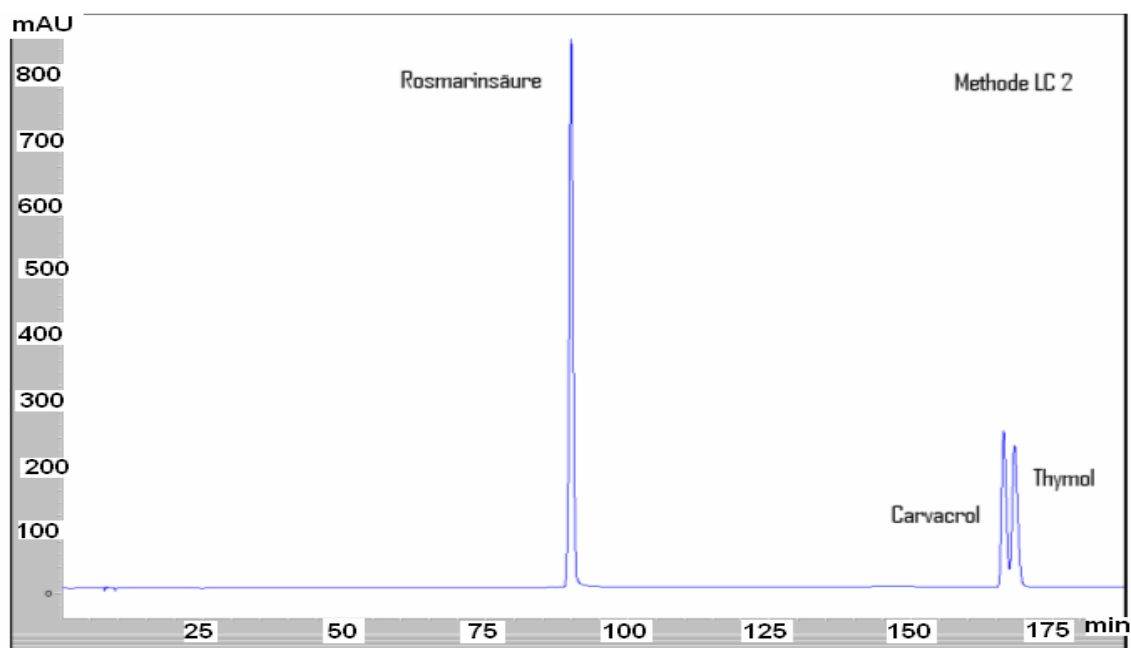


Abb. 4.3.4 : Trennung von 3 Standardsubstanzen mit Methode LC2, λ 280 nm

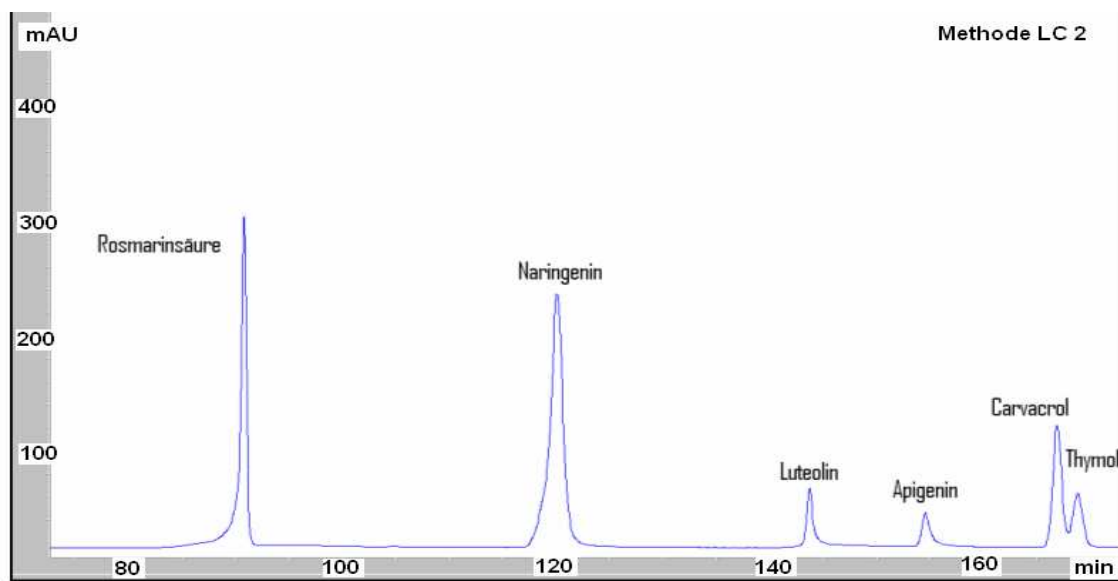


Abb. 4.3.5 : Trennung von 6 Standardsubstanzen mit Methode LC2, λ 280 nm

ERGEBNISSE

4.3.3 Spektroskopische Charakterisierung der Vergleichssubstanzen

Die Abbildungen 4.3.6 - 4.3.9 zeigen eine repräsentative Auswahl der aufs intensivste Maximum normierten Absorptionsspektren am Peakmaximum der Standardsubstanzen, wie sie für die Vergleichsdatenbank aufgenommen wurden. Dazu wurden die Laufmittelspektren vor und nach dem Peak vom Spektrum am Peakmaximum subtrahiert.

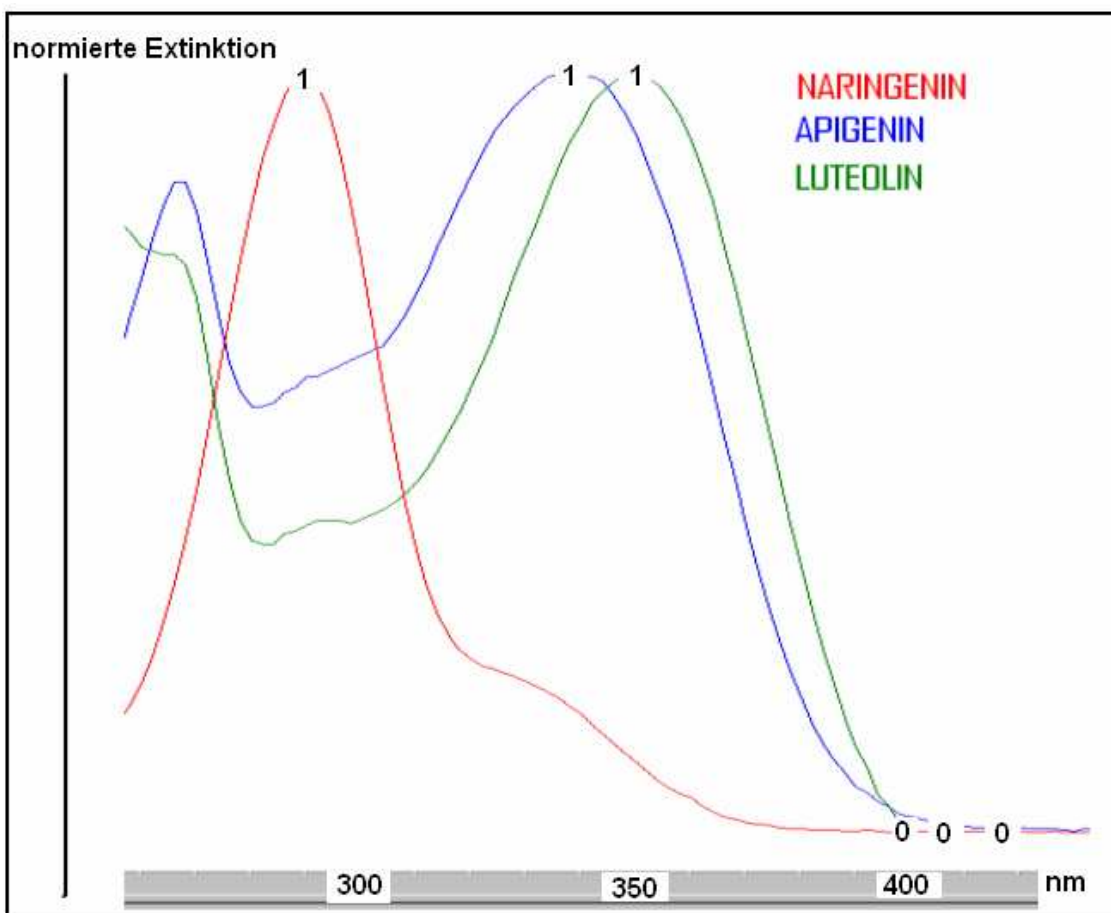


Abb. 4.3.6 : UV-Spektren von Naringenin, Apigenin und Luteolin

ERGEBNISSE

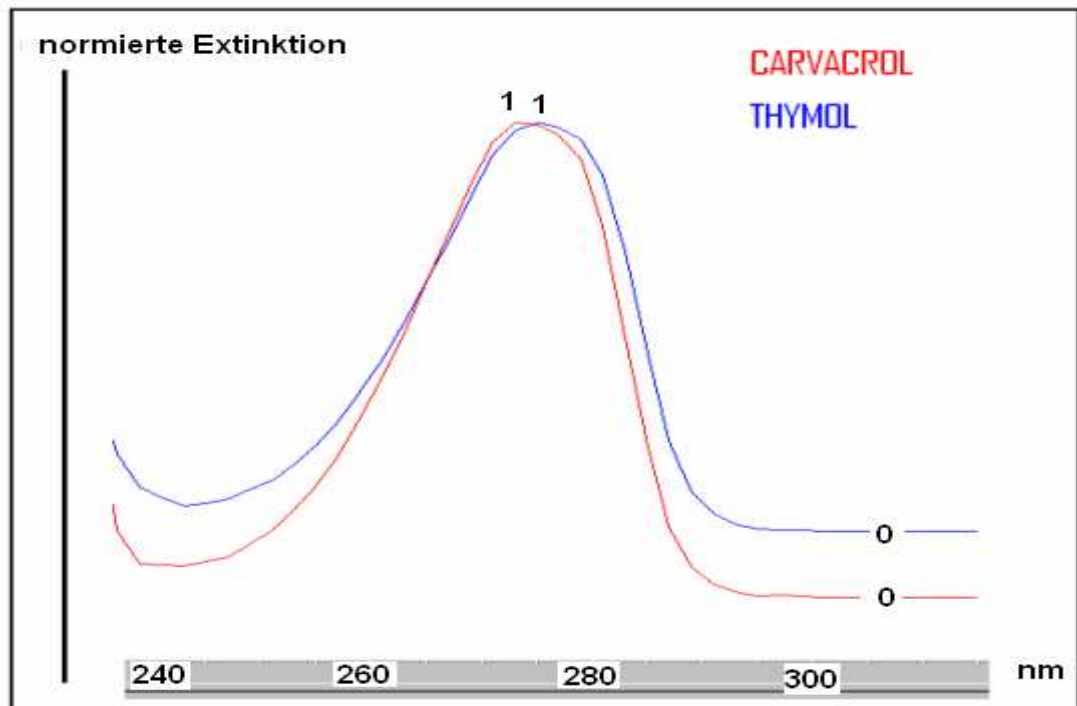


Abb. 4.3.7 : UV-Spektren der beiden Isomere Thymol und Carvacrol

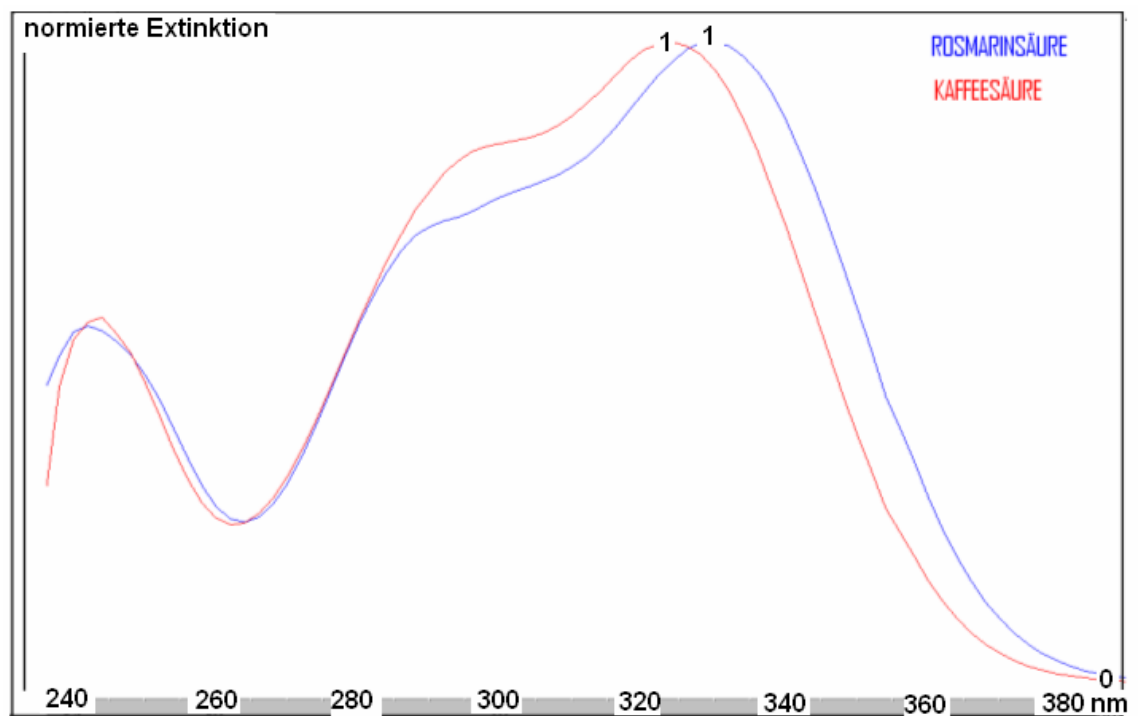


Abb. 4.3.8 : UV-Spektren von Rosmarinsäure und Kaffeesäure

ERGEBNISSE

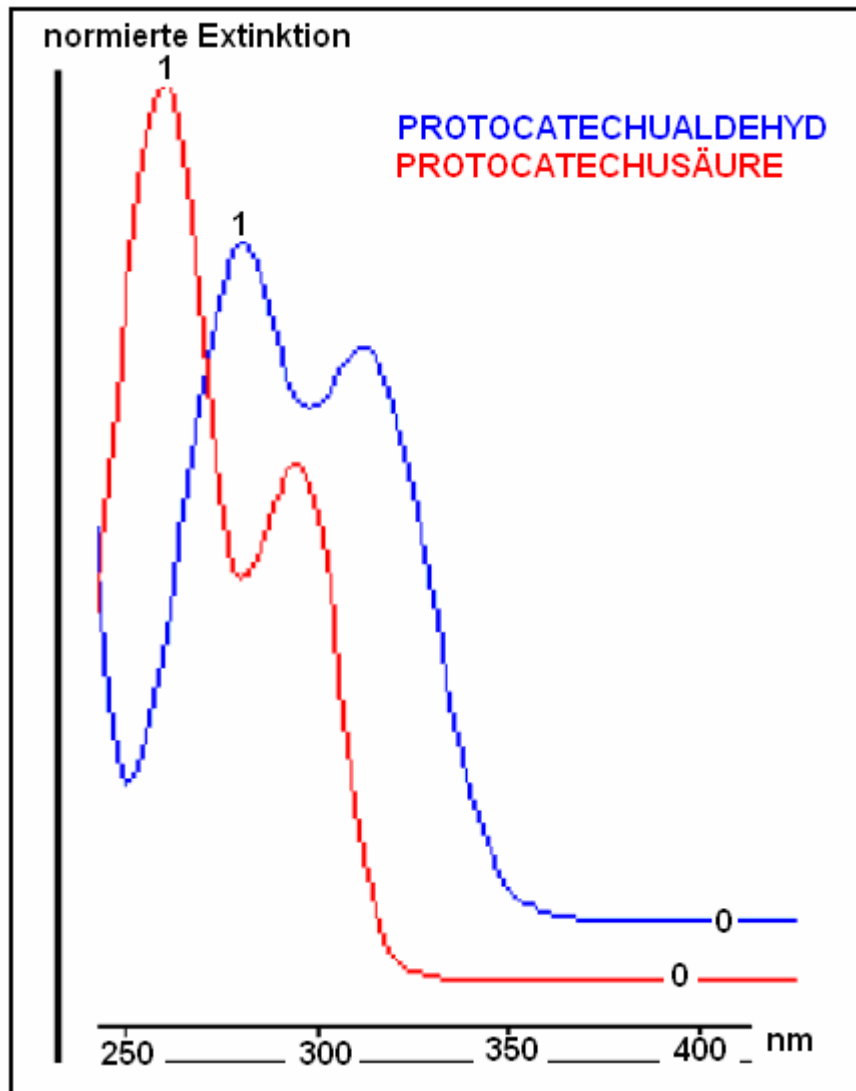


Abb. 4.3.9 : UV-Spektren von 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (Protocatechualdehyd) und 3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protocatechusäure)

ERGEBNISSE

Die verwendeten Standardsubstanzen sind zusammen mit Retentionszeiten (Rt) und Absorptionsmaxima in Tabelle 4.3.4 dargestellt.

Nr.	Substanz	Abk.	t _{Ret} [min]	λ _{max1} [nm]	λ _{max2} [nm]
1	Gallussäure	GS	8,5	271	-
2	Catechin	CAT	21,8	238	279
3	Kaffeesäure	KS	24,2	244	322
4	p-Cumarsäure	pCS	33,0	310	-
5	Rosmarinsäure	ROS	47,2	242	330
6	Kämpferol	KAE	62,8	265	366
7	Carvacrol	CAR	73,5	275	-
8	Thymol	THY	74,7	276	-
9	Luteolin	LUT	-	255	350
10	Vanillinsäure	VS	-	261	292
11	Naringenin	NAR	-	290	-
12	Apigenin	API	-	267	338
13	Protocatechusäure	PCS	-	265	295
14	Protocatechualdehyd	PCA	-	280	315

Tabelle 4.3.4 : Abkürzungen, Retentionszeiten (bei Methode LC1) sowie Absorptionsmaxima der verwendeten Vergleichssubstanzen

ERGEBNISSE

4.3.4 Analyse von Gewürzen

4.3.4.1 Herstellung der Extrakte und HPLC-Methoden

Von den untersuchten Proben wurde ein unbestrahlter und ein bestrahlter (10 kGy) Teil gleichzeitig aufgearbeitet. Dazu wurden die Gewürzproben in drei Extraktionen (EXTRAKT 1, EXTRAKT 2 und EXTRAKT GF) mit 80%igem, wässrigen Methanol durch dreitägiges Rühren in geschlossenen, dunklen Glasgefäßen bei Zimmertemperatur extrahiert. Die Extrakte wurden unverdünnt, bzw. 1:1 und 1:10 mit 2,5%iger Ameisensäure verdünnt, in die HPLC-Apparatur injiziert und mittels Methode LC2, LC1a und LC1 getrennt. Dies führte zu drei Messreihen (MR1, MR2, MR3).

Es wurden zwei HPLC-Messreihen (MR) mit den Trockengewürzen der Fa. Kottas und eine Messreihe mit den getrockneten Frischgewürzen (GF) aus Kärnten durchgeführt:

Trockengewürze	MR1	Methode LC2	unverdünnt	EXTRAKT 1
Trockengewürze	MR2	Methode LC1a	1:1	EXTRAKT 2
Gewürze Kärnten	MR3	Methode LC1	1:10	EXTRAKT GF

Die Trockengewürze und die Gewürze aus Kärnten (MR1, MR3) wurden mit den oben angeführten Methoden untersucht, wobei die Substanzen jeweils bei 280 nm detektiert wurden. Bei der Messreihe MR2, bei der ebenfalls je eine bestrahlte und eine unbestrahlte Trockengewürzprobe mit der Methode LC1a (Verdünnung 1:1, Fluss 0,8 ml/min) untersucht wurde, wurden die Chromatogramme bei drei Wellenlängen (250, 280, 335 nm) aufgenommen, um die teilweise höheren Extinktionen einiger Substanzen bei 250 und 335 nm zu nutzen.

Beispielsweise haben Rosmarinsäure und die Flavone Apigenin und Luteolin ihre Absorptionsmaxima im Bereich von 330 nm (s. Abb. 4.3.6, 4.3.8). Damit wird eine Überlagerung ihrer Signale durch andere Verbindungen, die nur unter 300 nm absorbieren, unterbunden. Dies erleichtert die qualitative Analyse. Die quantitative Analyse wurde bei 280 nm durchgeführt.

ERGEBNISSE

4.3.4.2 Chromatographische Trennungen und Detektion der Gewürzinhaltsstoffe

In den folgenden Abbildungen sind jeweils drei Chromatogramme von Oregano (Abb. 4.3.10-12), Thymian (Abb. 4.3.13-15), Salbei (Abb. 4.3.16-18) und eines von Rosmarin (Abb. 4.3.19) dargestellt. Rosmarin wurde nur als getrocknetes Frischgewürz untersucht. Die Abbildungen, erhalten mit Methode LC2 (Extrakt 1) und LC1 (Extrakt GF), zeigen zum Vergleich jeweils ein Chromatogramm bei 0 kGy und bei 10 kGy. Wegen der rein optisch sehr großen Ähnlichkeit dieser Chromatogramme wurde bei Methode LC1a auf die Darstellung der bestrahlten Proben verzichtet. Bei LC1a wurden die Chromatogramme bei drei Wellenlängen, 250, 280 und 335 nm aufgezeichnet, und in den Abbildungen 4.3.11, 4.3.14 und 4.3.17 wiedergegeben. Aus Gründen der besseren Übersicht sind die den Peak-Nummern zugeordneten Verbindungen/Derivate ebenfalls angegeben. Eine Peak-Nummer mit "n.i." bedeutet, dass die Verbindung zwar über ihre Peakfläche ausgewertet, jedoch nicht identifiziert/zugeordnet werden konnte.

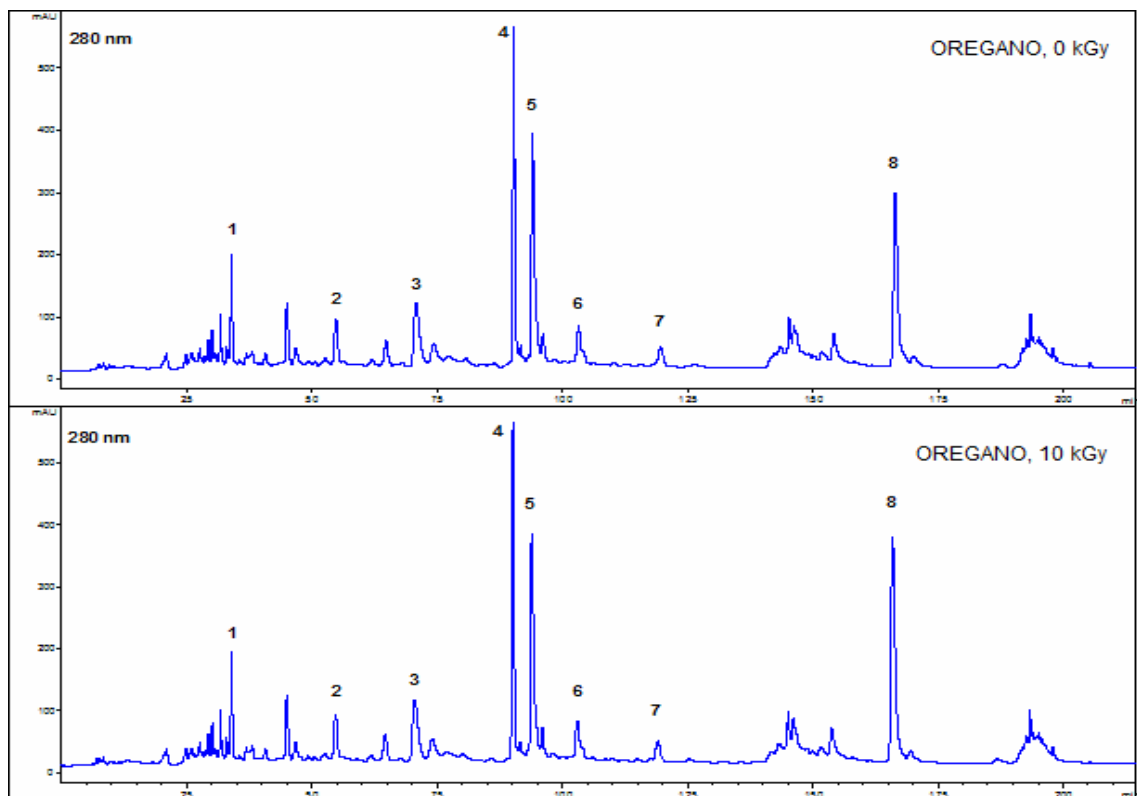


Abb. 4.3.10: Chromatogramme des Oregano Extrakts 1 (Methode LC2, unverdünnt). Nummerierte Peaks: 1: n.i., 2: VS/PCS-Der., 3: LUT-Der., 4: ROS, 5: API-Der., 6: LUT-Der, 7: NAR, 8: CAR

ERGEBNISSE

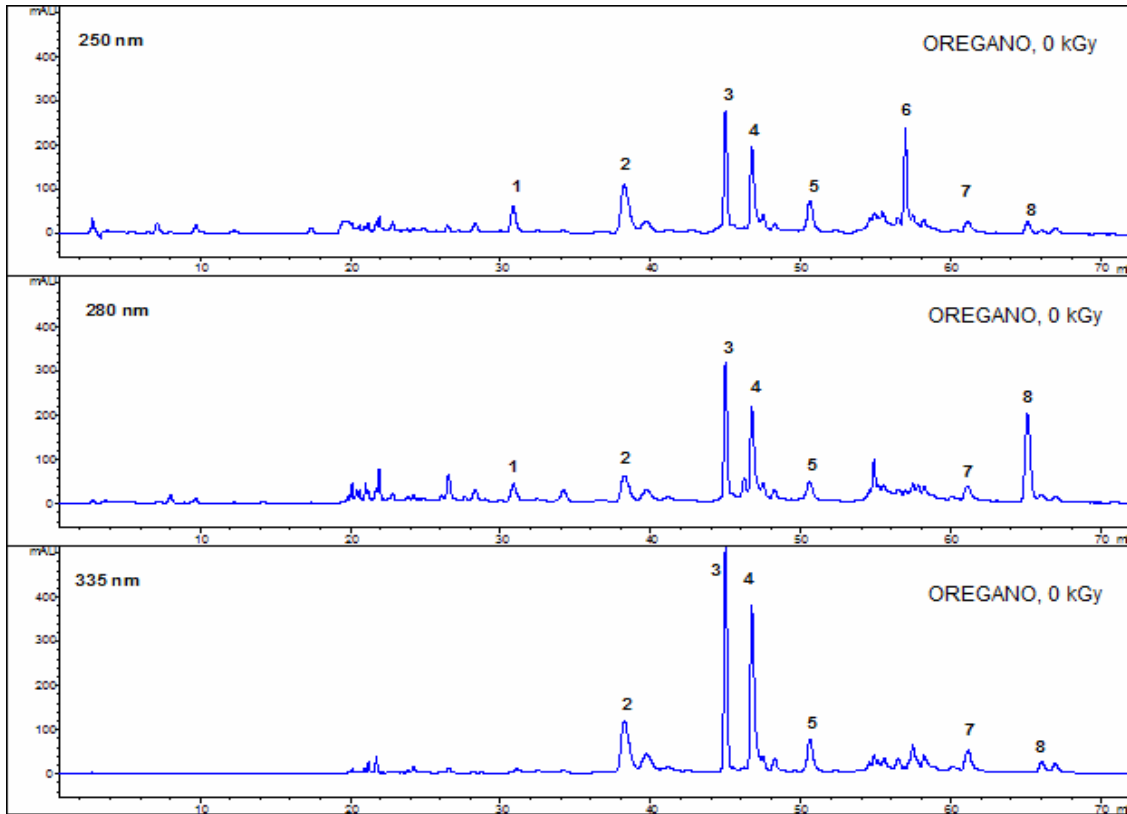


Abb. 4.3.11: Chromatogramme des Oregano Extrakts 2 (Methode LC1a, 1:1). Nummerierte Peaks: 1: VS/PCS-Der., 2: LUT-Der., 3: ROS, 4: API-Der., 5: LUT-Der., 6: n.i., 7: n.i., 8: CAR

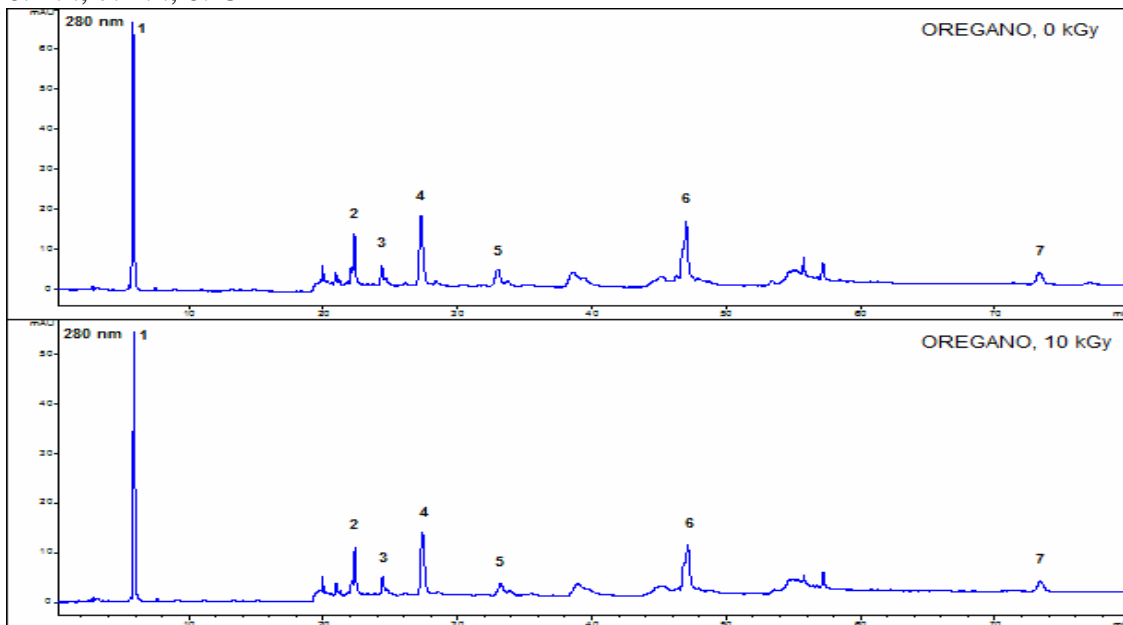


Abb. 4.3.12: Chromatogramme des Oregano Extrakts GF (Methode LC1, 1:10). Nummerierte Peaks: 1: n.i., 2: n.i., 3: KS, 4: API-Der., 5: pCS, 6: ROS, 7: CAR

ERGEBNISSE

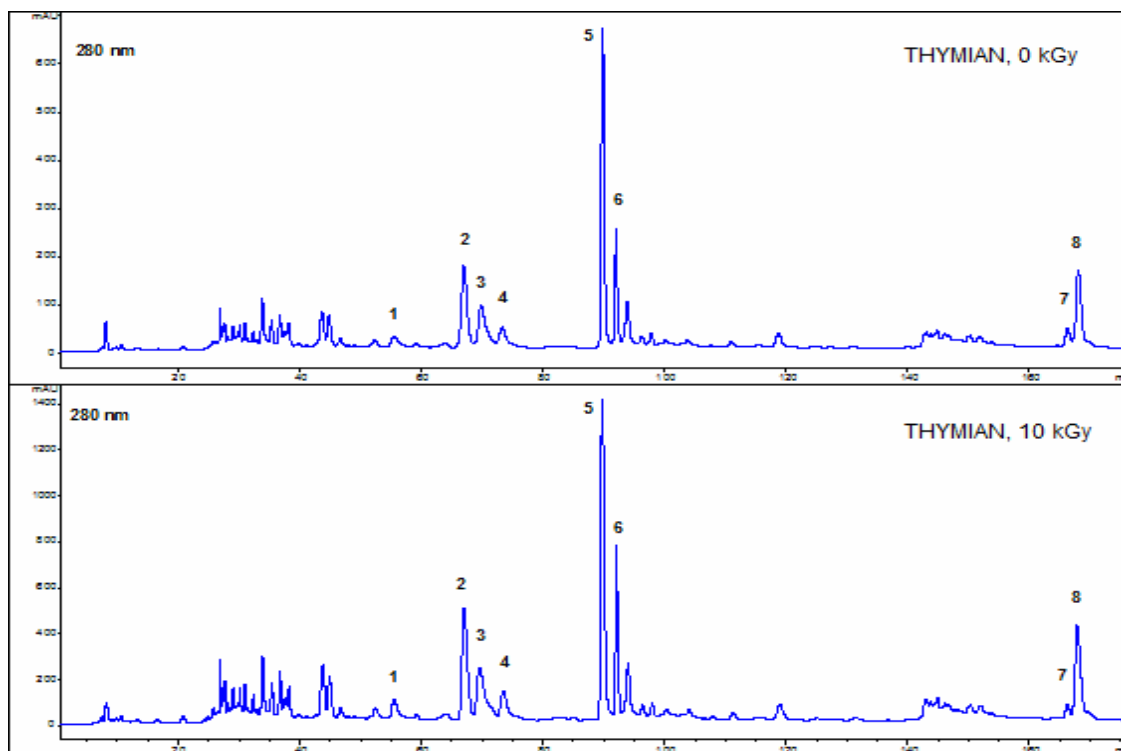


Abb. 4.3.13: Chromatogramme des Thymian Extrakts 1 (Methode LC2, unverdünnt). Nummerierte Peaks: 1: n.i. 2: KS/ROS-Der., 3: LUT-Der., 4: LUT-Der., 5: ROS, 6: [PCA], 7: CAR, 8: THY

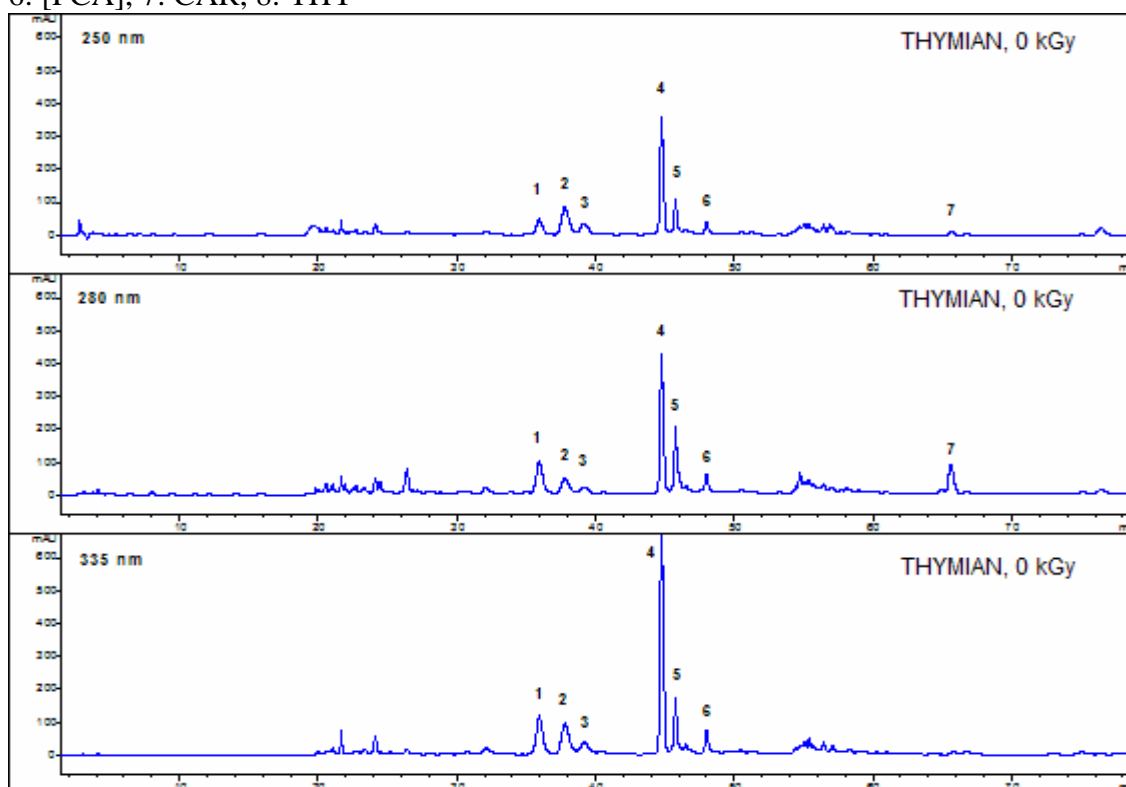


Abb. 4.3.14: Chromatogramme des Thymian Extrakts 2 (Methode LC1a, 1:1). Nummerierte Peaks: 1: KS/ROS-Der., 2: LUT-Der., 3: LUT-Der., 4: ROS, 5: [PCA], 6: ROS/KS-Der., 7: THY

ERGEBNISSE

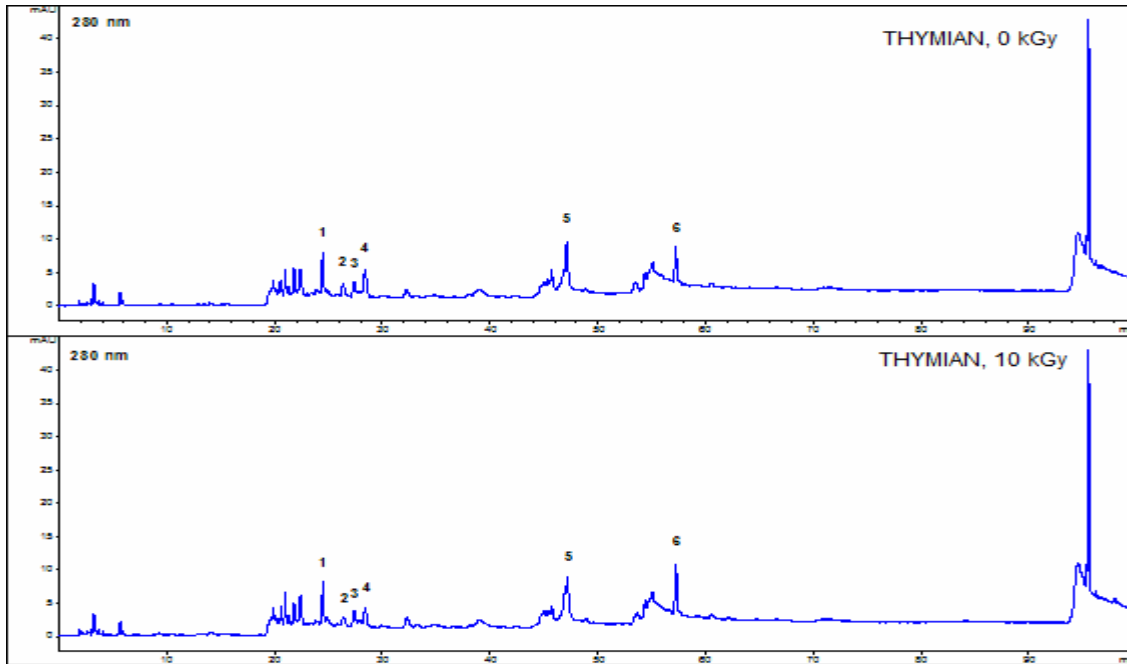


Abb. 4.3.15: Chromatogramme des Thymian Extrakts GF (Methode LC1, 1:10). Nummerierte Peaks: 1: KS, 2: n.i., 3: API-Der., 4: n.i., 5: ROS, 6: NAR

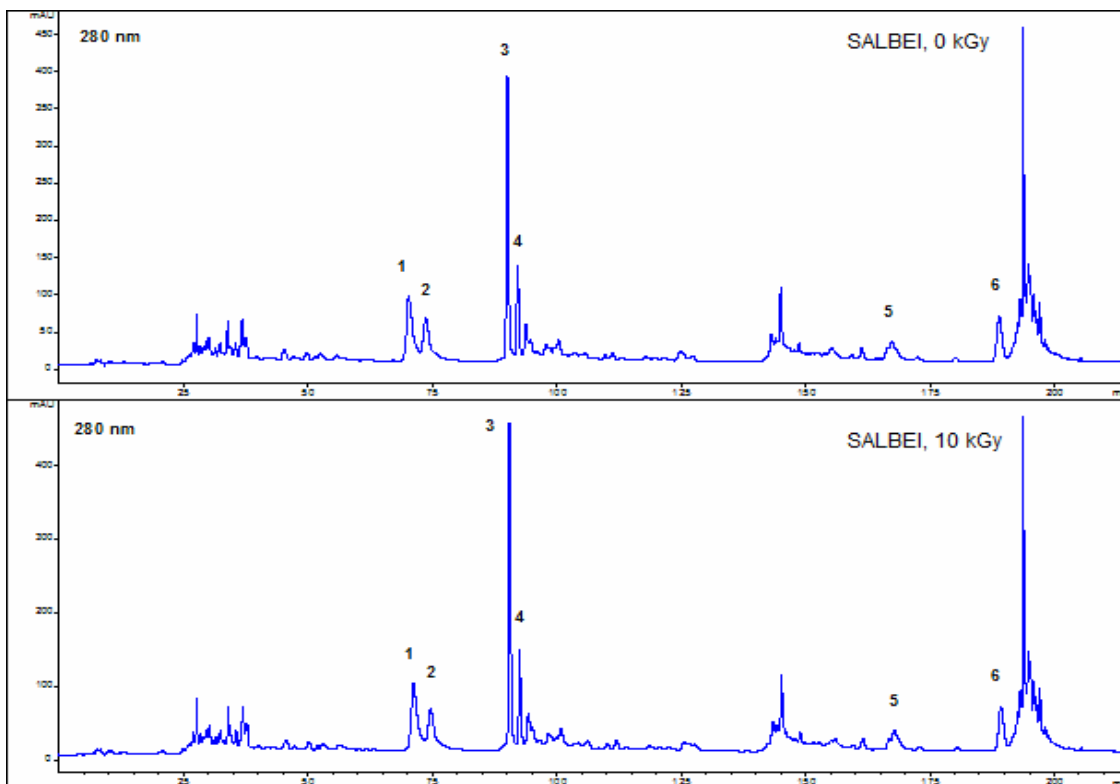


Abb. 4.3.16: Chromatogramme des Salbei Extrakts 1 (Methode LC2, unverdünnt). Nummerierte Peaks: 1: LUT-Der., 2: LUT-Der., 3: ROS, 4: [PCA], 5: n.i., 6: n.i.

ERGEBNISSE

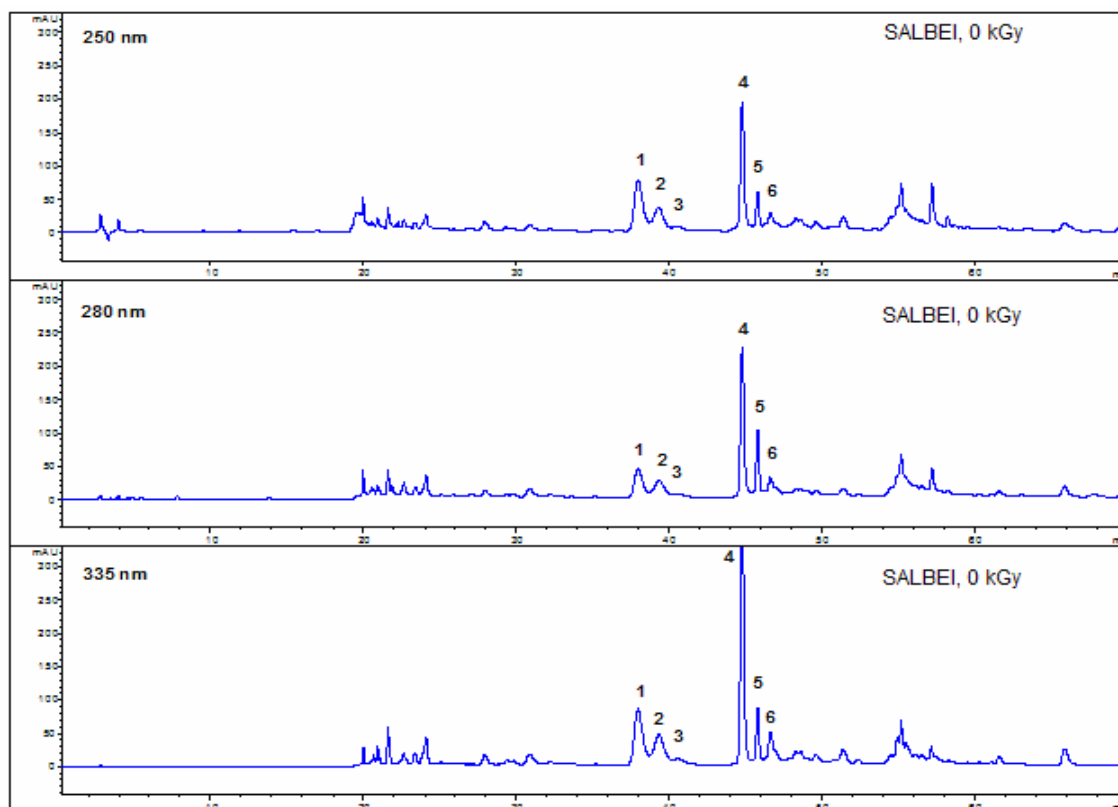


Abb. 4.3.17: Chromatogramme des Salbei Extrakts 2 (Methode LC1a, 1:1). Nummerierte Peaks: 1: LUT-Der., 2: LUT-Der., 3: LUT-Der., 4: ROS, 5: [PCA], 6: API-Der.

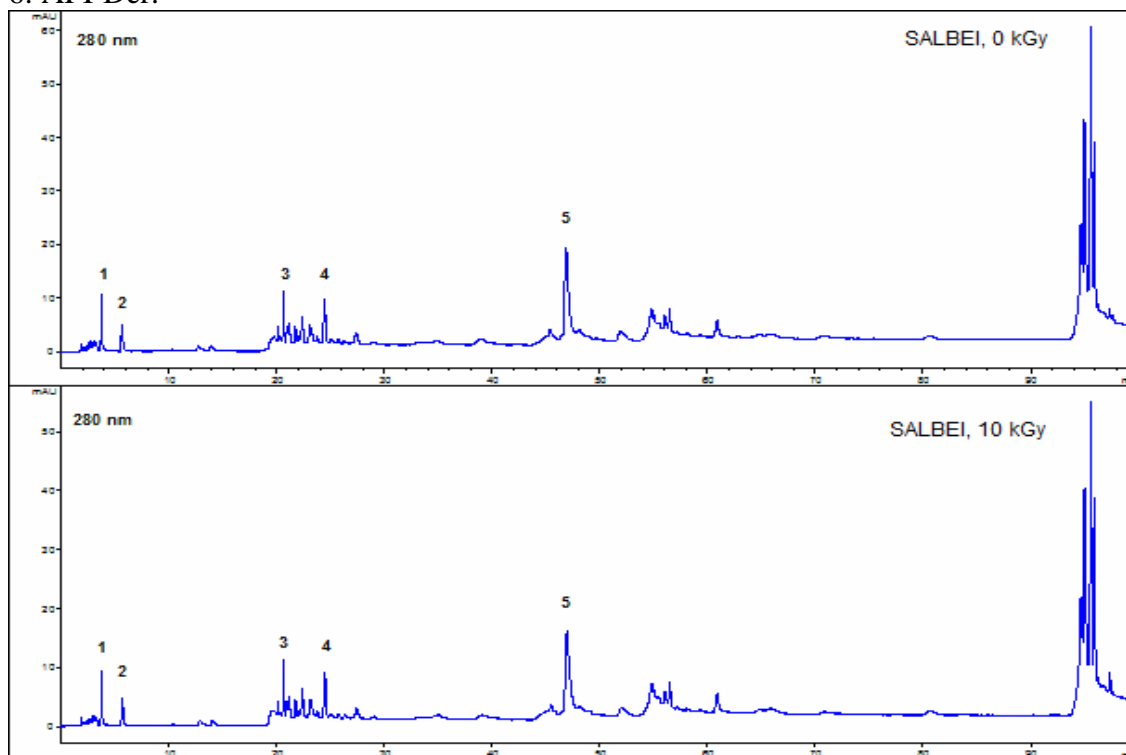


Abb. 4.3.18: Chromatogramme des Salbei Extrakts GF (Methode LC1, 1:10). Nummerierte Peaks: 1: n.i., 2: n.i., 3: n.i., 4: KS, 5: API-Der.

ERGEBNISSE

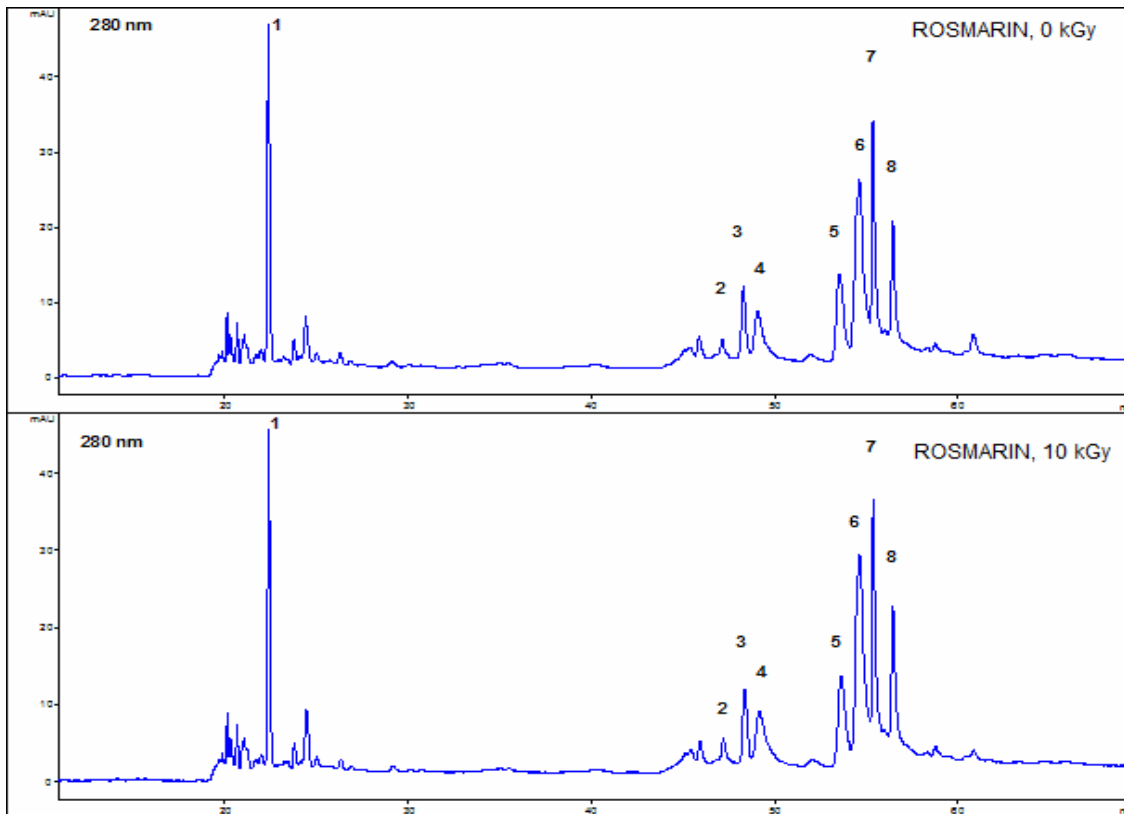


Abb. 4.3.19: Chromatogramme des Rosmarin Extrakts GF (Methode LC1, 1:10). Nummerierte Peaks: 1: n.i., 2: ROS, 3: n.i., 4: LUT-Der., 5: n.i., 6: n.i., 7: n.i., 8: API-Der.

4.3.4.3 Identifizierung bzw. Zuordnung der Substanzen

Für die qualitative Beurteilung der Chromatogramme, sowie für die in Kapitel 4.3.4.4 folgende mengenmäßige Abschätzung der Hauptkomponenten, wurden bei allen HPLC Untersuchungen willkürlich gut getrennte Peaks mit signifikanter Extinktion ausgewählt, aber auch solche, die schon aufgrund laufender Untersuchungen und Vergleichsspektren einer bekannten Substanz zugeordnet werden konnten, auch wenn diese nicht perfekt getrennt waren. Für die Identifizierung bzw. Zuordnung zu einer Verbindungsklasse wurden die Retentionszeiten und/oder die UV-Spektren der Reinsubstanzen herangezogen.

ERGEBNISSE

OREGANO

Die den Peaknummern in den HPLC Chromatogrammen Abb. 4.3.10-12 zugeordneten Verbindungen sind zusammen mit ihren Retentionszeiten bei den verschiedenen HPLC Methoden in Tabelle 4.3.5 zusammengefasst.

Peak	Extrakt 1/LC2		Extrakt 2/LC1a		Extrakt GF/ LC1	
	Unverdünnt, 0.3 ml/min		1:1, 0.8 ml/min		1:10, 0.8 ml/min	
Nr.	Substanz	Rt min	Substanz	Rt min	Substanz	Rt min
1	n.i., λ_{\max} 285nm	33.9	VS/PCS-Der	30.8	n.i., λ_{\max} 280nm	5.8
2	VS/PCS-Der	55.5	LUT-Der	37.8	n.i., λ_{\max} 280nm	22.3
3	LUT-Der	69.8	ROS	44.8	KS	24.3
4	ROS	89.7	API-Der	46.7	API-Der.*	27.3
5	API-Der	94.1	LUT-Der	50.7	pCS	33.0
6	LUT-Der	103.3	n.i., λ_{\max} 260 nm	56.9	ROS	47.0
7	NAR	119.7	n.i.	61.1	CAR	73.4
8	CAR	166.4	CAR	65.1		

Tabelle 4.3.5: HPLC-Analyse von Oregano; Peaknummern, Substanzen und Retentionszeiten. *Apigenin ähnlich, s. Abb. 4.3.20.

Trockengewürz:

Rosmarinsäure und Carvacrol konnten anhand von Vergleichssubstanzen in allen Messreihen identifiziert werden. Naringenin war nur im Extrakt 1 (Peak 7/LC2) eindeutig nachweisbar. Weiters konnten aufgrund der Absorptionsspektren zwei Verbindungen einem Derivat von Apigenin (API-Der.; Peak 5/LC2; Peak 4/LC1a) und einem von Luteolin (LUT-Der.; Peak 3/LC2; Peak 2/LC1a,) zugeordnet werden. Es dürfte sich dabei um Glucoside dieser Verbindungen handeln, denn Aglykone dieser Verbindungen würden bedeutend später eluiert werden. Apigenin-Glucosid wurde beispielsweise von Tsimogannis et al., 2006, als Inhaltsstoff von Oregano gefunden (s. Tabelle 4.3.1). Weiters wurde Peak 2 (LC2) und Peak 1 (LC1a) einem Derivat von Protocatechusäure bzw. Vanillinsäure (VS/PCS-Der.) zugeordnet. Da diese beiden Substanzen sehr ähnliche Absorptionsspektren besitzen, war ohne Einsatz der LC-MS eine exakte Zuordnung zu einer einzelnen Verbindung nicht möglich. Peak 7 (LC1a) liegt nicht rein vor – die Maxima der UV-Absorption liegen bei 290 nm und 345 nm, reines Apigenin absorbiert bei 267 nm und 338 nm - und der Test auf Peak-Reinheit mit dem Rechenprogramm der HP CHEMStation® zeigte auch, dass es sich bei diesem

ERGEBNISSE

Signal um eine Mischung aus mindestens zwei Substanzen handelt. Peak 1 (LC2) sowie Peak 6 (LC1a) konnten keiner Verbindungsklasse zugeordnet werden. Aufgrund des ähnlichen Absorptionsverhaltens der Substanz unter Peak 2 und Peak 5 bei drei Wellenlängen (Methode LC1a, Chromatogramm Abb. 4.3.11), minimale Absorption bei 280 nm, ähnliche Absorption bei 250 und 335 nm (s. auch UV-Spektrum Luteolin, Abb. 4.3.6), wurde auch Peak 5 einem Luteolin Derivat zugeschrieben. Die Verbindung unter Peak 6 (LC1a) absorbiert ausschließlich bei 250 nm, es kann daher ein Kaffeesäure-Derivat oder eine flavonoide Verbindung ausgeschlossen werden.

Getrocknetes Frischgewürz

Im Unterschied zum Trockengewürz sind in der Oregano Probe aus Kärnten Kaffeesäure und p-Cumarsäure nachweisbar. Übereinstimmend finden sich Rosmarinsäure und Carvacrol. Das Spektrum des einem API-Der. zugeordneten Peaks 4 ist nur teilweise mit dem Spektrum von Apigenin identisch. Auffallend war die starke Absorption der Substanz unter dem Peak 1 bei einer Retentionszeit von 5.8 min. Eine Identifizierung war jedoch, ebenso wie für Peak 2, nicht möglich.

THYMIAN

Die den Peaknummern in den HPLC Chromatogrammen Abb. 4.3.13-15 zugeordneten Verbindungen sind zusammen mit ihren Retentionszeiten und Absorptionsmaxima bei den verschiedenen HPLC Methoden in Tabelle 4.3.6 zusammengestellt.

Trockengewürz:

In allen Proben waren Rosmarinsäure und Thymol nachweisbar, ferner zwei Derivate von Luteolin (LUT-Der.; Peak 3,4: LC2; Peak 2,3: LC1a) und eines von Kaffee- bzw. Rosmarinsäure (Peak 2, LC2; Peak 1, LC1a). Carvacrol war nur im Extrakt 1 (Peak7/LC2) zu detektieren. Die Substanzen unter Peak 6 (LC2) und Peak 5 (LC1a) weisen ein Spektrum auf, welches dem des Protocatechualdehyds (Abb. 4.3.4) sehr ähnlich ist (leichte Blauverschiebung der beiden Maxima bei gleichem Extinktionsverhältnis). Diese Substanz wurde auch in den Messreihen von Salbei gefunden (Tabelle 4.3.7). Sie wird in der Folge als [PCA] bezeichnet. Die zu Peak 6 (LC1a) gehörige Verbindung zeigt ein ähnliches Absorptionsverhalten wie Rosmarinsäure bzw. Kaffeesäure (Abb. 4.3.8), daher wird angenommen, dass es ein

ERGEBNISSE

Derivat einer dieser Verbindungen ist. Übereinstimmend mit Literaturangaben (Tabelle 4.3.2) sind folgende Inhaltsstoffe: Rosmarinsäure, Carvacrol, Thymol und ein Luteolin-Derivat, welches in der Literatur als Glucuronid beschrieben wurde (Dapkevicius et al., 2002).

Peak	Extrakt 1/LC2		Extrakt 2/LC1a		Extrakt GF/LC1	
	Unverdünnt, 0.3 ml/min		1:1, 0.8 ml/min		1:10, 0.8 ml/min	
Nr.	Substanz	Rt min	Substanz	Rt min	Substanz	Rt min
1	n.i., λ_{\max} 280/345 nm	55.5	KS/ROS	35.9	KS	24.3
2	KS/ROS	67.0	LUT-Der	38.3	n.i., λ_{\max} 285 nm	26.3
3	LUT-Der	70.3	LUT-Der	39.2	API-Der.*	27.3
4	LUT-Der	73.3	ROS	44.8	n.i., λ_{\max} 290 nm	28.4
5	ROS	90.1	[PCA]	45.8	ROS	47.0
6	[PCA]	92.2	ROS/KS	48.0	NAR	57.2
7	CAR	166.4	THY	65.7		
8	THY	168.0				

Tabelle 4.3.6: HPLC-Analyse von Thymian: Peaknummern, Substanzen, Absorptionsmaxima und Retentionszeiten. *Apigenin ähnlich, s. Abb 4.3.20

Getrocknetes Frischgewürz

Im Chromatogramm des Thymian Extraktes GF (Abb. 4.3.15) wurden die Substanzen Kaffesäure (Peak 1), Rosmarinsäure (Peak 5) und Naringenin (Peak 6) identifiziert. Die Substanz unter Peak 3 zeigte, wie Peak 4 beim Chromatogramm des Oregano-Extraktes, ein Apigenin-ähnliches Spektrum. Die Peaks 2 und 4 konnten keiner Verbindung zugeordnet werden. Gemeinsam mit dem Trockengewürz Thymian ist nur Rosmarinsäure.

SALBEI

Die den Peaknummern in den HPLC Chromatogrammen Abb. 4.3.16-18 zugeordneten Verbindungen sind zusammen mit ihren Retentionszeiten bei den verschiedenen HPLC Methoden in Tabelle 4.3.7 zusammengefasst.

ERGEBNISSE

Peak Nr.	Extrakt 1/LC2		Extrakt 2/LC1a		Extrakt GF/LC1	
	Unverdünnt, 0.3 ml/min		1:1, 0.8 ml/min		1:10, 0.8 ml/min	
	Substanz	Rt min	Substanz	Rt min	Substanz	Rt min
1	LUT-Der	70.8	LUT-Der.	37.9	n.i. (Schulter)	3.7
2	LUT-Der.	73.3	LUT-Der.	39.3	n.i., λ_{\max} 265 nm	5.6
3	ROS*	90.3	LUT-Der.	40.6	n.i. λ_{\max} 260 nm	20.6
4	[PCA]	92.2	ROS	44.8	KS	24.6
5	n.i., λ_{\max} 270/335 nm	167.4	[PCA]	45.8	API-Der.	47.0
6	n.i., λ_{\max} 275 nm	189.0	API-Der.	46.7		

Tabelle 4.3.7: HPLC-Analyse von Salbei Trockengewürz: Peaknummern, Substanzen und Retentionszeiten. * Bei Peak 3, (LC2), dürfte das API-Der in ROS mit ROS überlappen.

Trockengewürz:

In den Chromatogrammen der Salbei Extrakte (Abb. 4.3.16 und 4.3.17) wurde nur Rosmarinsäure (Peak 3: LC2 bzw. 4: LC1a) identifiziert. Das Spektrum der Rosmarinsäure im Lauf mit Methode LC2 weist Anteile von Apigenin auf, die jedoch aufgrund des hohen Überschusses an Rosmarinsäure deren mengenmäßige Abschätzung nicht beeinflussen. Es finden sich mehrere Substanzen, deren Absorptionsspektren große Ähnlichkeit mit dem des Luteolins (Maxima bei 255 und 350 nm) aufweisen (LC2: Peak 1 und 2, LC1a: Peak 1, 2 und 3). Eine Identifizierung dieser Verbindungen war leider nicht möglich. Die Substanz unter Peak 4 (LC2) und unter Peak 5 (LC1a) weist wieder das bereits bei Thymian beschriebene blauverschobene Protocatechualdehyd-Spektrum auf. Peak 5 und 6 (LC2) konnten keiner bekannten Verbindung zugeordnet werden. Ihre Absorptionsmaxima sind in Tabelle 4.3.7 angeführt.

Getrocknetes Frischgewürz:

Auffallend ist (Abb. 4.3.18), dass die Signale im Chromatogramm relativ klein sind. Der einzige mit Sicherheit zuzuordnende Peak im Chromatogramm des Salbei Extraktes GF (Abb. 4.3.18) ist Kaffeesäure (Peak 4). Sowohl Retentionszeit als auch Absorptionsspektrum stimmen mit denen der Standardsubstanz überein. Kaffeesäure wurde auch im Kärntner Oregano (Peak 3) und Thymian (Peak 1) gefunden. Die

ERGEBNISSE

Verbindungen unter Peak 2 und 3 absorbieren im kurzwelligen Bereich und konnten keiner bekannten Verbindung zugeordnet werden. Das Absorptionsmaximum der Substanz unter Peak 1 liegt im kurzwelligen Bereich und wurde daher im festgelegten Messbereich nicht erfasst. Die Substanz unter Peak 5 zeigt ein Apigenin-ähnliches Spektrum, mit leichten Anteilen des Rosmarinsäure-Spektrums, was nicht zuletzt daran liegt, dass diese Substanz gleichzeitig mit der Rosmarinsäure eluiert. Ein mathematischer Test auf Reinheit des Peaks mit dem Rechenprogramm der HP CHEMStation® zeigte auch, dass es sich hier um eine Mischung aus zumindest zwei Substanzen handelt.

ROSMARIN

Die den Peaknummern im HPLC Chromatogramm Abb. 4.3.19 zugeordneten Verbindungen sind zusammen mit ihren Absorptionsmaxima und Retentionszeiten in Tabelle 4.3.8 angegeben.

Extrakt GF/LC1		
Verd. 1:10, Fluss: 0.8 ml/min		
Peak Nr.	Substanz	Rt min
1	n.i., λ_{\max} 280nm	22.3
2	ROS	47.0
3	n.i., λ_{\max} 290nm	48.3
4	LUT-Der.	49.1
5	n.i., λ_{\max} 260nm	53.6
6	n.i.*	54.6
7	n.i.*	55.4
8	API-Der.	56.5

Tabelle 4.3.8: HPLC-Analyse von Rosmarin (getrocknetes Frischgewürz). Peaknummern, Substanzen, Absorptionsmaxima und Retentionszeiten. * Peak 6 und 7 haben ein ähnliches Spektrum wie API, siehe Abb. 4.3.20.

Im Unterschied zum Chromatogramm des Thymian-Extraktes (Abb. 4.3.15) sind bei jenem des Rosmarinextraktes viele Peaks mit deutlichen Absorptionen zu erkennen (Abb. 4.3.19). Dennoch konnte nur Rosmarinsäure (Peak 2) eindeutig identifiziert werden. Peak 4 und Peak 8 weisen, aufgrund der Absorptionsspektren, auf Derivate von Luteolin und Apigenin hin. Die Substanzen unter Peak 6 und 7 zeigen ein dem Apigenin nur teilweise ähnliches Spektrum (Abb. 4.3.20). Eine genauere Klassifizierung zu einer

ERGEBNISSE

Verbindung/Derivat war nicht möglich. Ähnliche Spektren, jedoch bei einer kürzeren Retentionszeit von 27.3 min, wiesen auch die Chromatogramme von Thymian GF (Peak 3) und Oregano GF (Peak 4) auf (s. Tabellen 4.3.6 und 4.3.5). Die Peaks 1, 3 und 5 konnten keiner bekannten Verbindung zugeordnet werden.

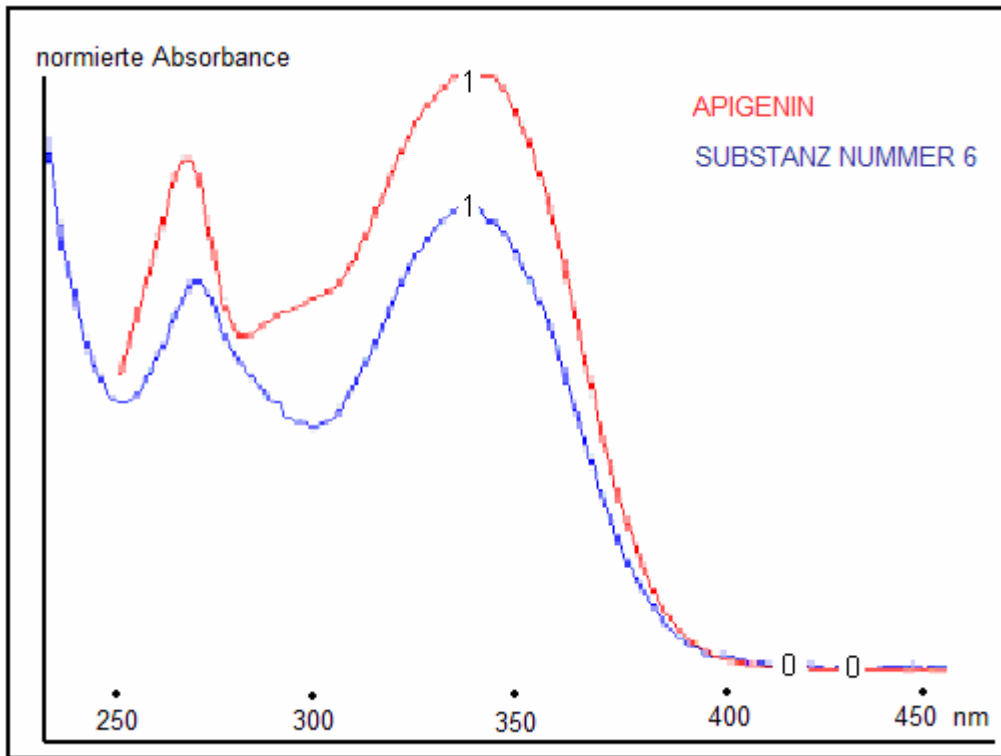


Abb 4.3.20 : Vergleich der Spektren des Apigenins (rot) und der Substanz Nummer 6 (blau) im Chromatogramm des Rosmarin-Extraktes (bzw. Peak 4, Oregano und Peak 3, Thymian)

Zusammenfassung der qualitativen Analyse

Trockengewürze

Die in 80% Methanol löslichen Extrakte der Gewürzproben wiesen eine Vielzahl von Substanzen auf, was starke Peak-Überlappungen zur Folge hatte. Von den 14 eingesetzten Referenzsubstanzen (Tabelle 4.3.4) waren nur 4 eindeutig nachzuweisen: ROS, CAR, THY und NAR (letzteres nur in Oregano). Von Flavonoid-Derivaten lagen keine Vergleichssubstanzen vor. Dennoch waren einige klar zu erkennen. Derivate von Luteolin fanden sich in allen Gewürzen. Bei Oregano und Salbei war zusätzlich noch ein Derivat von Apigenin feststellbar. Ebenso konnten Derivate von

ERGEBNISSE

Vanillinsäure/Protocatechussäure (Oregano) und Kaffeesäure/Rosmarinsäure (Thymian) detektiert werden.

Getrocknete Frischgewürze

Die qualitative Analyse der Kärntner Gewürze ergab, abgesehen von Rosmarinsäure, eine deutlich andere Zusammensetzung als die der im Handel erhaltenen Trockengewürze. Die Luteolin- und Apigenin-Derivate, die in den Trockengewürzen als Hauptprodukte vorlagen, waren hier nicht nachweisbar. Hinzuweisen ist auf das häufige Auftreten von Kaffeesäure (Oregano, Thymian, Salbei) und auf das von p-Cumarsäure (Oregano). Beide Verbindungen wurden in den von Shan et al., 2005, untersuchten Gewürzen nachgewiesen (Tabellen 4.3.1-4.3.3).

4.3.4.4 Mengenmäßige Abschätzung der Hauptkomponenten in unbestrahlten und bestrahlten Gewürzen

Um einen möglichen Einfluss der Bestrahlung der Trockengewürze bzw. der getrockneten Frischgewürze auf den Gehalt der in Kapitel 4.3.4.2 beschriebenen Inhaltsstoffe bewerten zu können, wurden die Peakflächen in den Chromatogrammen der Extrakte der unbestrahlten und bestrahlten Parallelproben miteinander verglichen. Wenn nicht anders angegeben wurden alle mit Peaknummern versehenen Verbindungen zur Flächenintegration herangezogen. Von Extrakt 1 (LC1a) wurden aus Vergleichsgründen nur die Peaks erhalten bei 280 nm ausgewertet. Die Einheit für die Peakfläche (dem Integral zwischen Signal und Basislinie im Chromatogramm) ist mAU (milli *Absorption Unit* mal Sekunde). Alle in den folgenden Balkendiagrammen dargestellten Peakflächen sind Mittelwerte aus der Integration von jeweils drei aufeinander folgenden chromatographischen Läufen desselben Extraktes.

Die Integration erfolgte automatisch durch das Rechenprogramm der HP CHEMStation® nach einem vorgegebenen Algorithmus. Dabei wird vom Computer eine variable Basislinie gezogen und Peaks automatisch erkannt und integriert. Es wurde besonders darauf geachtet, dass alle ausgewerteten Peaks jeweils bei allen unbestrahlten und bestrahlten Proben-Chromatogrammen auf die gleiche Art integriert wurden, d.h. dass die Basislinien gleich gelegt wurden. Das musste speziell bei schlecht getrennten Peaks gelegentlich manuell nachkorrigiert werden. Dabei wurden einzelne Peaks in der Regel durch vertikale Linien (vom Rechenprogramm) voneinander getrennt (Abb. 4.3.21). Die Integrationen waren sehr gut reproduzierbar – dieselbe Probe lieferte bei mehrmaliger Injektion aus demselben Proberöhrchen Abweichungen <3%, unabhängig von der Peakgröße.

ERGEBNISSE

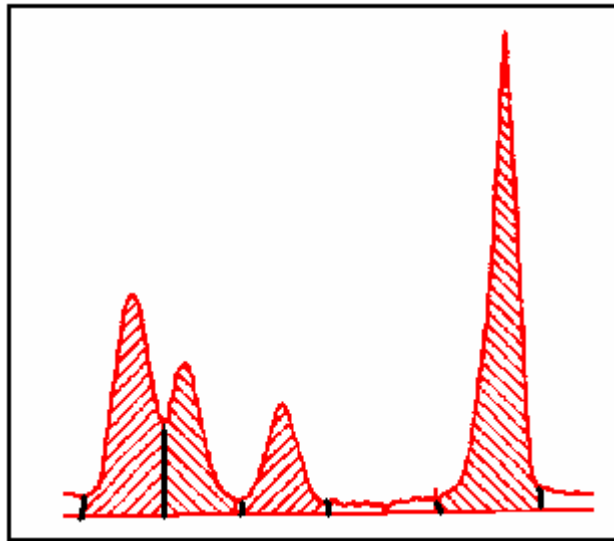


Abb. 4.3.21 : Peakintegration bei unvollständiger Trennung

In den folgenden Abbildungen sind die Peakflächen der ausgewählten Inhaltsstoffe der untersuchten Gewürze bei 0 kGy und 10 kGy dargestellt: Oregano (Abb. 4.3.22-4.3.24), Thymian (Abb. 4.3.25-4.3.27), Salbei (Abb. 4.3.28-4.3.30) und Rosmarin (Abb. 4.3.31). Die Verbindungen, denen die Peaknummern entsprechen, sind bei jeder Abbildung angeführt.

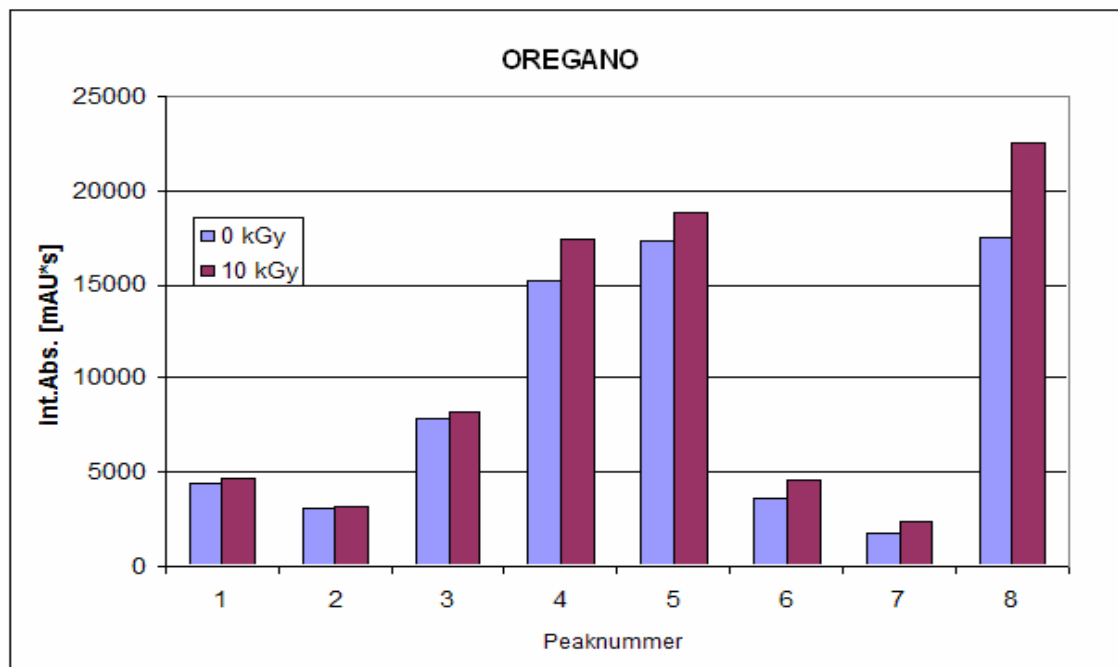


Abb. 4.3.22 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Oregano-Extrakt 1 (Methode LC2). Nummerierte Peaks: 1: n.i., 2: VS/PCS-Der., 3: LUT-Der., 4: ROS, 5: API-Der., 6: LUT-Der, 7: NAR, 8: CAR

ERGEBNISSE

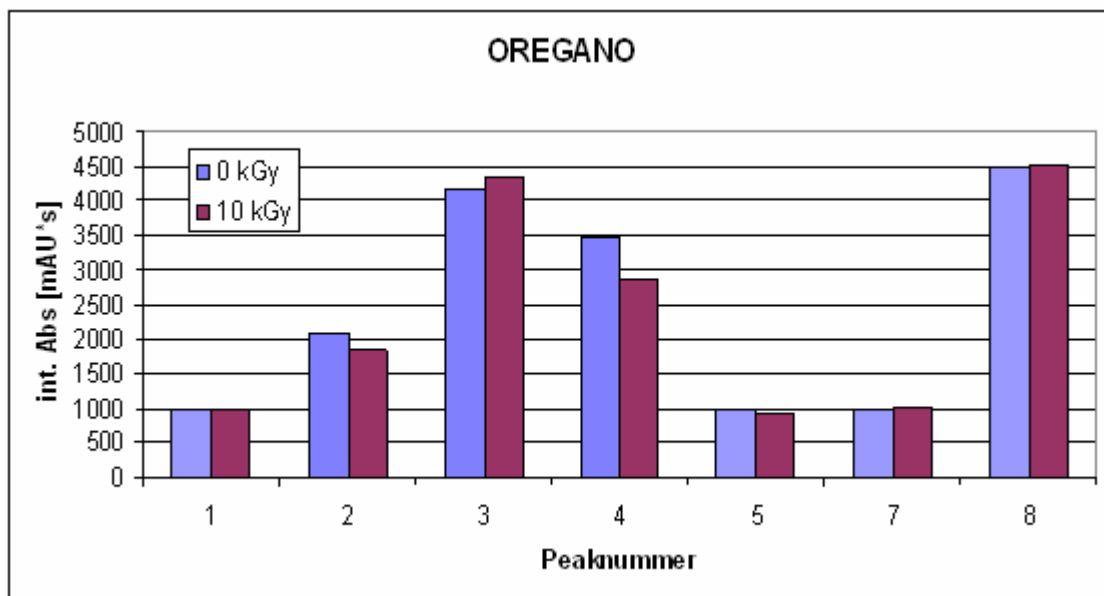


Abb. 4.3.23 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Oregano-Extrakt 2 (Methode LC1a). Nummerierte Peaks: 1: VS/PCS-Der., 2: LUT-Der., 3: ROS, 4: API-Der., 5: LUT-Der., 6: n.i. (keine Absorption bei 280 nm), 7: n.i., 8: CAR

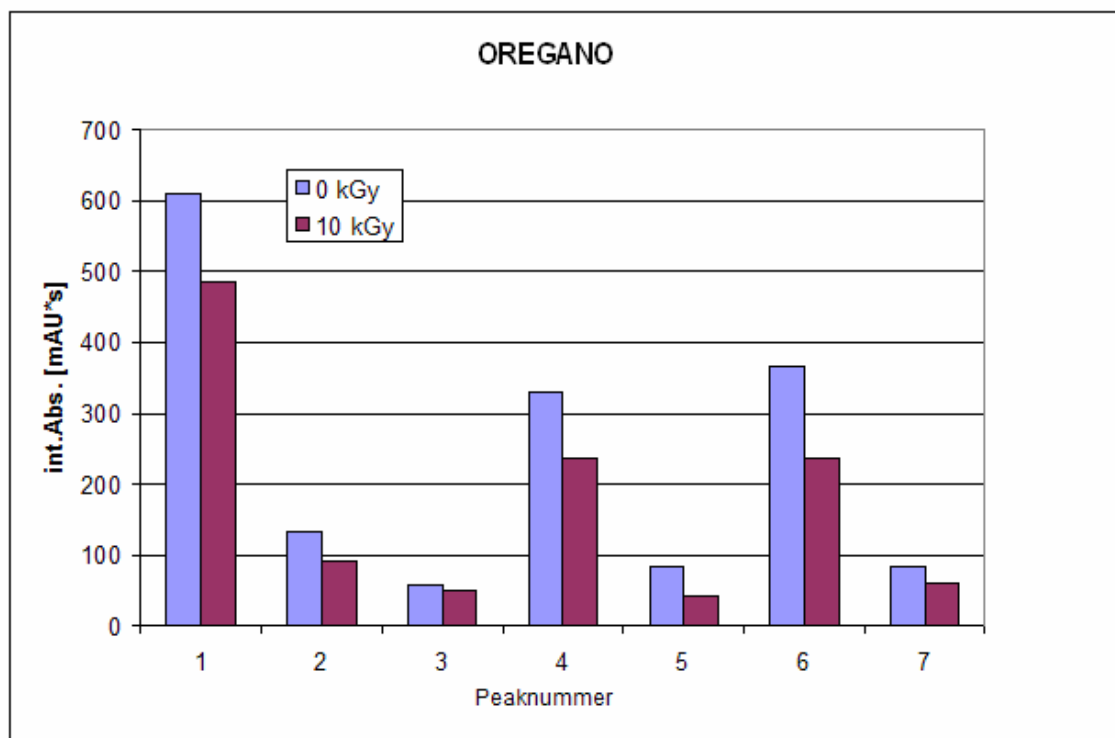


Abb. 4.3.24 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Oregano-Extrakt GF (Methode LC1). Nummerierte Peaks: 1: n.i., 2: n.i., 3: KS, 4: API-ähnlich, 5: pCS, 6: ROS, 7: CAR

ERGEBNISSE

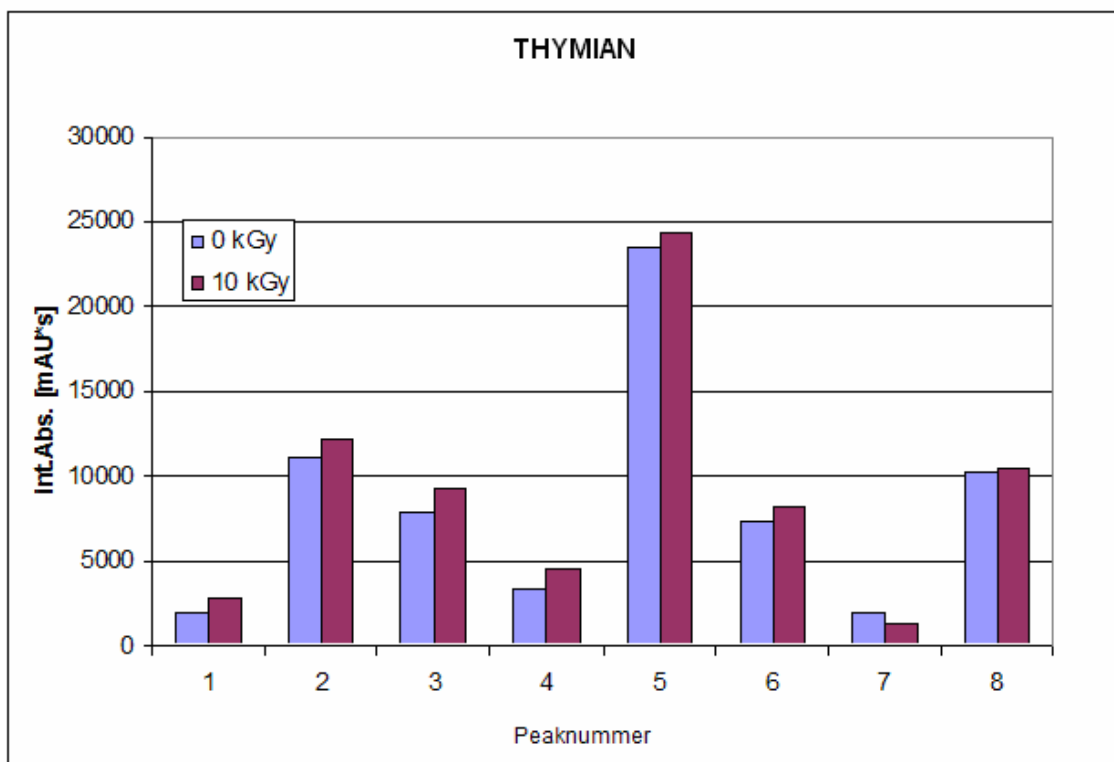


Abb. 4.3.25 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Thymian-Extrakt 1 (Methode LC2). Nummerierte Peaks: 1: n.i. 2: KS/ROS-Der., 3: LUT-Der., 4: LUT-Der., 5: ROS, 6: [PCA], 7: CAR, 8: THY

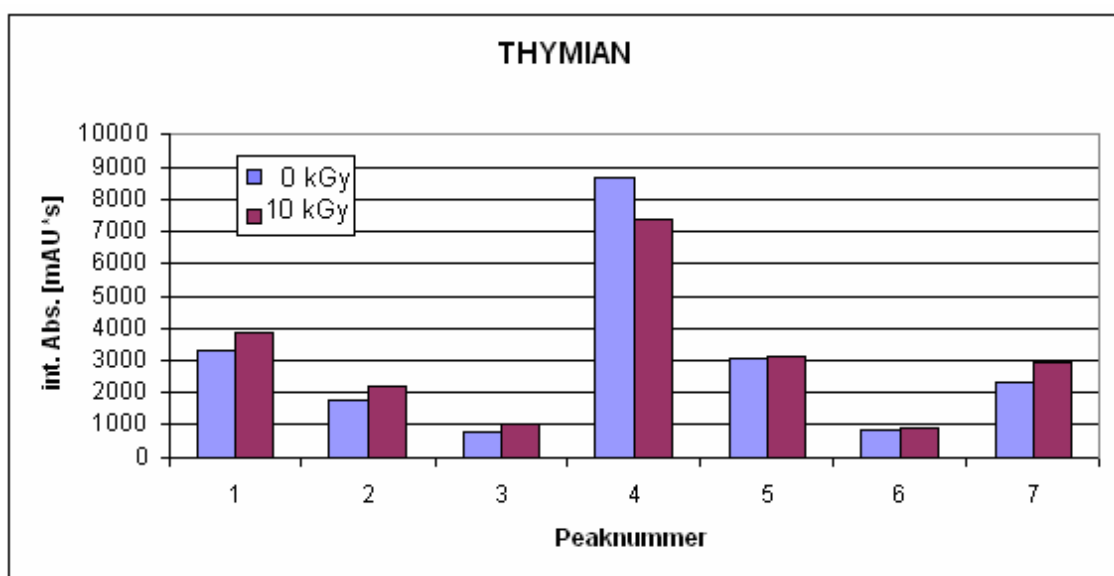


Abb. 4.3.26 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Thymian-Extrakt 2 (Methode LC1a). Nummerierte Peaks: 1: KS/ROS-Der., 2: LUT-Der., 3: LUT-Der., 4: ROS, 5: [PCA], 6: ROS/KS-Der., 7: THY, 8: n.i.

ERGEBNISSE

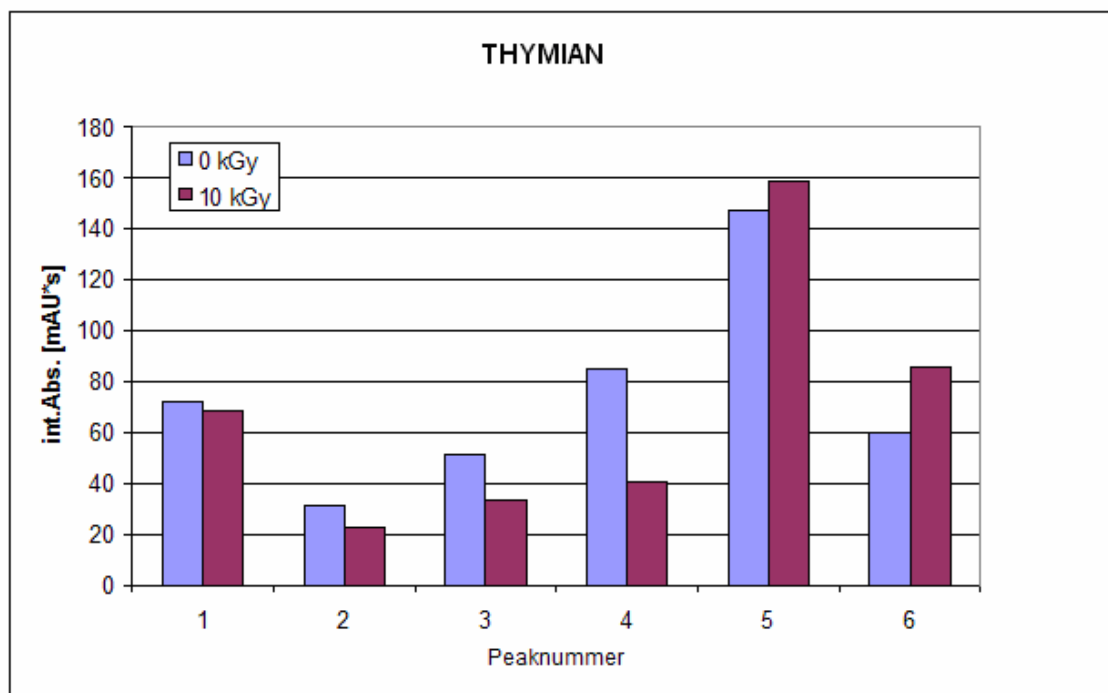


Abb. 4.3.27 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Thymian-Extrakt GF (Methode LC1). Nummerierte Peaks: 1: KS, 2: n.i., 3: API-Der., 4: n.i., 5: ROS, 6: NAR

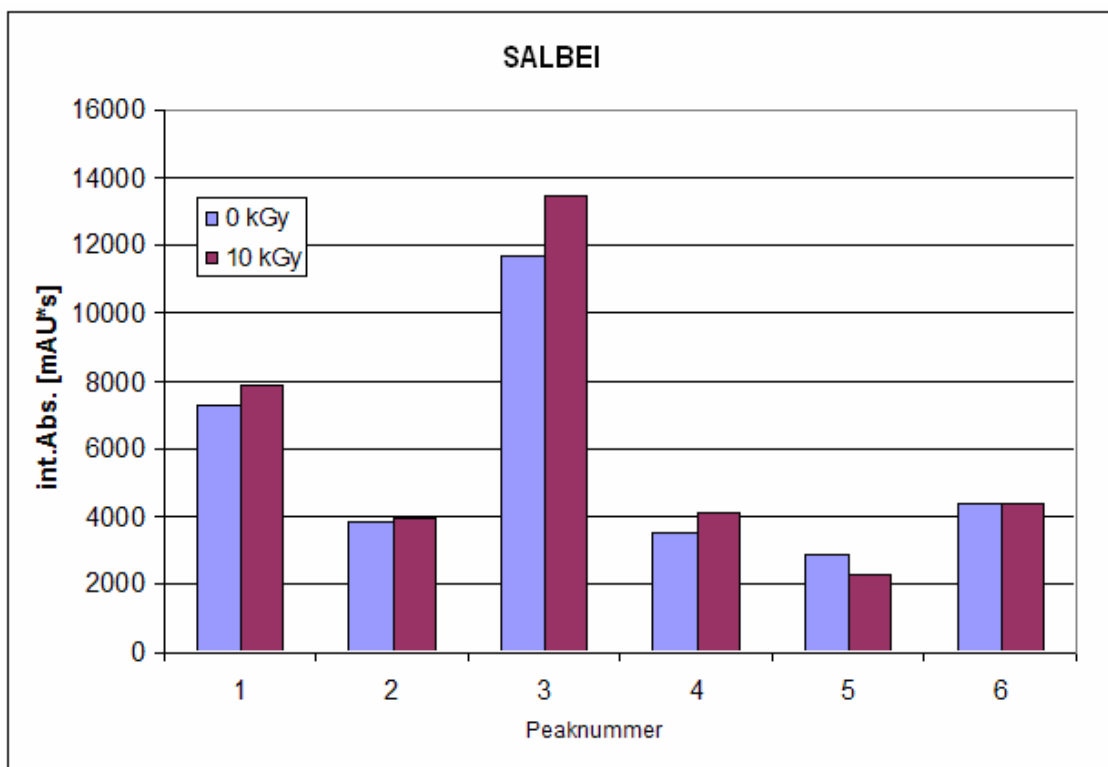


Abb. 4.3.28 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Salbei-Extrakt 1 (Methode LC2). Nummerierte Peaks: 1: LUT-Der., 2: LUT-Der., 3: ROS, 4: [PCA], 5: n.i., 6: n.i.

ERGEBNISSE

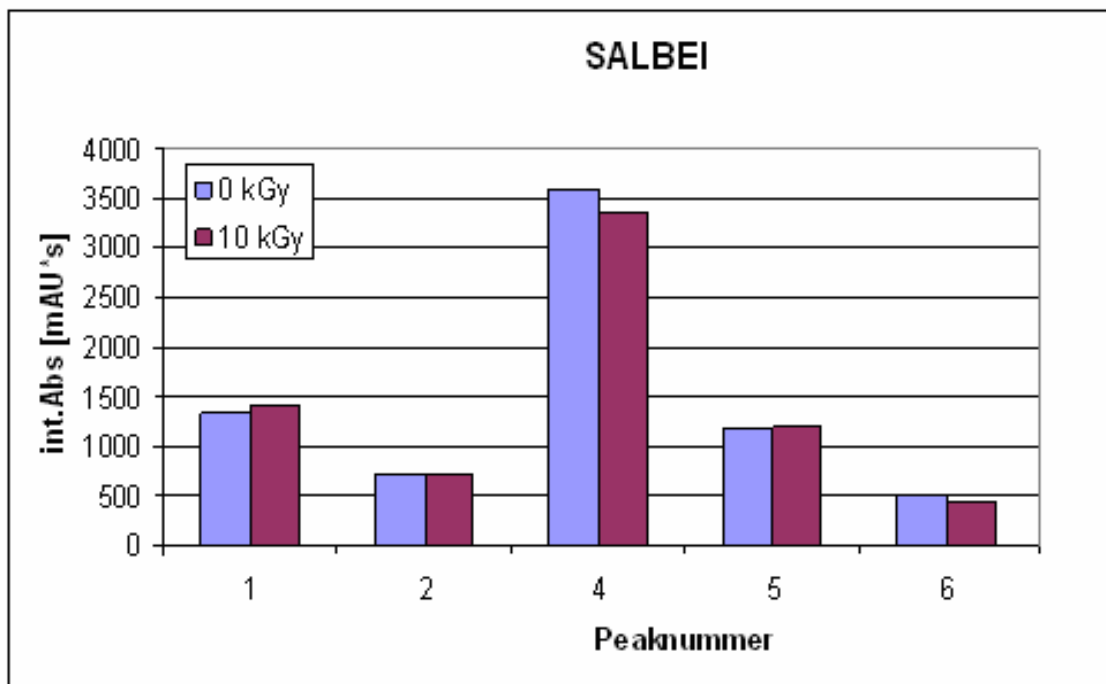


Abb. 4.3.29 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Salbei-Extrakt 2 (Methode LC1a). Nummerierte Peaks: 1: LUT-Der., 2: LUT-Der., 3: LUT-Der., 4: ROS, 5: [PCA], 6: API-Der.

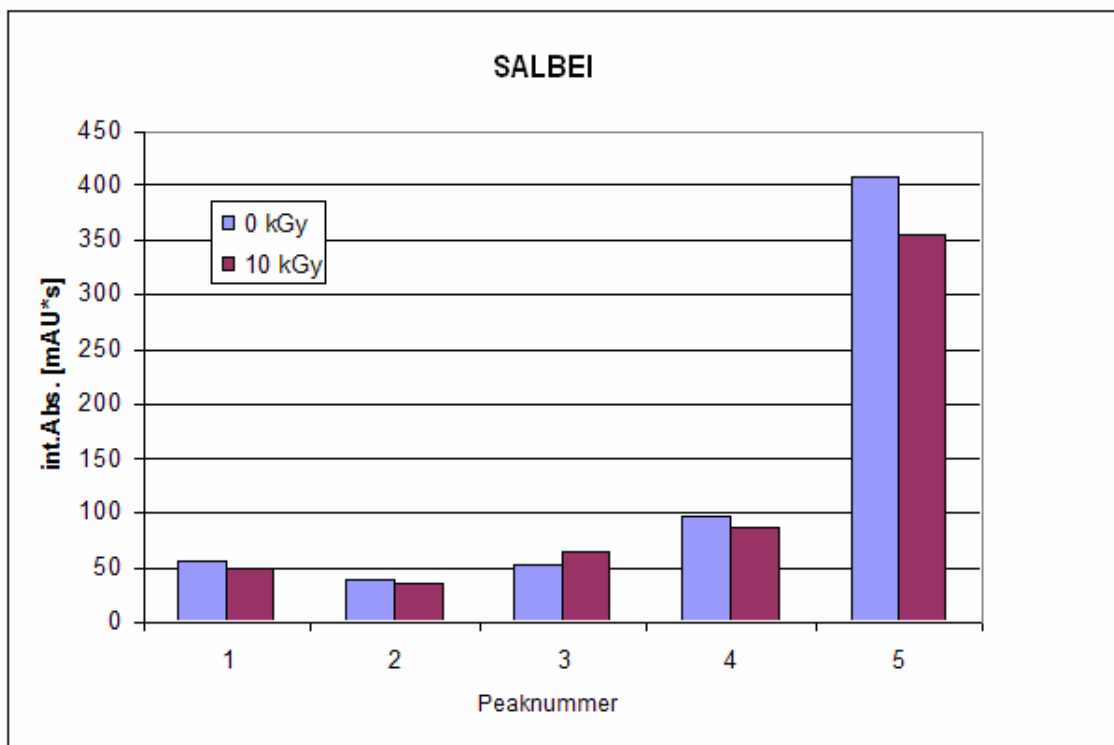


Abb. 4.3.30 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Salbei-Extrakt GF (Methode LC1). Nummerierte Peaks: 1: n.i., 2: n.i., 3: n.i., 4: KS, 5: API-Der.

ERGEBNISSE

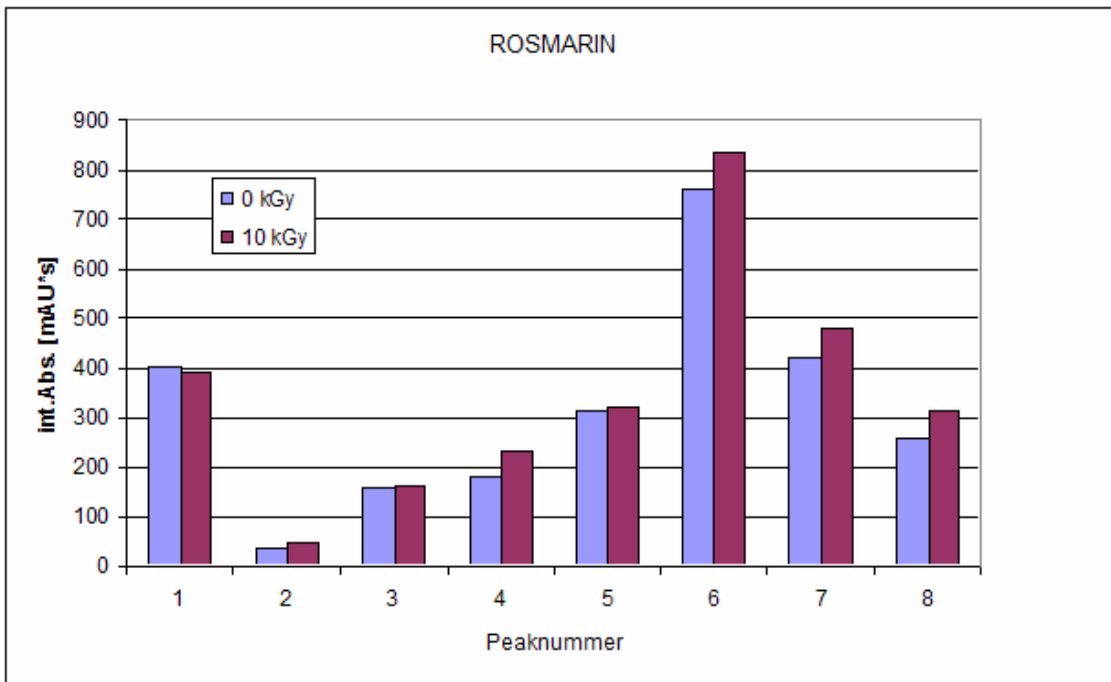


Abb. 4.3.31 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Rosmarin-Extrakt GF (Methode LC1). Nummerierte Peaks: 1: n.i., 2: ROS, 3: n.i., 4: LUT-Der., 5: n.i., 6: n.i., 7: n.i., 8: API-Der.

OREGANO, Trockengewürz

Ein Vergleich der Peakflächen von bestrahlten und unbestrahlten Proben lässt keinen einheitlichen Einfluss der Bestrahlung erkennen. Während in Extrakt 1 (Abb. 4.3.22) eine Zunahme aller Peakflächen in der bestrahlten Probe zu beobachten ist, zeigen sich in Extrakt 2 (Abb. 4.3.23) unterschiedliche Ergebnisse. Cavacrol, das die stärkste Zunahme in Extrakt 1 zeigt, bleibt praktisch unverändert, ebenso wie das VS/PCS-Derivat, das LUT-Derivat (Peak 5) und die Substanz unter Peak 7. Das LUT-Derivat (Peak 2) weist eine Abnahme auf, ebenso wie das API-Derivat (Peak 4). Letzteres sogar eine signifikante. Eine Zunahme ist in Extrakt 2 nur für Rosmarinsäure zu erkennen, die jedoch deutlich geringer ist als jene in Extrakt 1. Diese Differenzen, vor allem aber die generelle Zunahme der Peakflächen nach Bestrahlung bei Extrakt 1, weisen auf eine entscheidende Rolle der Extraktion hin. Bei Extrakt 1 dürfte die Extraktionseffizienz bei der bestrahlten Probe größer gewesen sein.

ERGEBNISSE

OREGANO, getrocknetes Frischgewürz

Als einzige Probe aller Messreihen zeigen alle integrierten Peakflächen bei den Chromatogrammen des Oregano-Extraktes der im Labor getrockneten Frischgewürze eine deutliche Abnahme (Abb. 4.3.24). Grund dafür ist mit großer Wahrscheinlichkeit eine gewisse Restfeuchte, die bei der Verarbeitung zurückblieb. Durch die Anwesenheit von Wasser während der Bestrahlung kann es zu Abbaureaktionen der Inhaltsstoffe kommen, induziert durch die Primärprodukte der Wasserradiolyse (s. Kapitel Wasserradiolyse 2.1.4)

THYMIAN, Trockengewürz

Hier besteht eine bessere Übereinstimmung der Peakflächen beider Extrakte im Vergleich zu denen des Oregano. Generell ist eine Zunahme der Peakflächen der bestrahlten Probe im Vergleich zur unbestrahlten zu erkennen. Nur die Peakfläche der Rosmarinsäure zeigt einmal eine Zunahme (LC2, Abb. 4.3.25) und einmal eine deutliche Abnahme (LC1a, Abb. 4.3.26). Die einzige Verbindung, die in den Chromatogrammen der ersten Extraktion eine Abnahme zeigt, ist Carvacrol.

THYMIAN, getrocknetes Frischgewürz

Die Peakflächen 1, 2, 3 und 4 zeigen hier eine teils deutliche Abnahme (z.B. bei Peak 4: über 50%), während die Peakflächen der Rosmarinsäure und des Naringenins zunehmen (s. Abb. 4.3.27). Die Restfeuchtigkeit dürfte hier keinen Einfluss auf die Konzentration der Substanzen haben.

SALBEI, Trockengewürz

Es ist kein eindeutiger Trend festzustellen. Bei den ersten 4 Peaks in den Chromatogrammen der ersten Extraktion (Abb. 4.3.28) ist eine Zunahme der Peakflächen zu beobachten, wobei diejenige von Rosmarinsäure (Peak 3) am meisten zunimmt (15,5%). Die Fläche von Peak 5 nimmt ab, während die von Peak 6 gleich bleibt. Die Peakflächen der Hauptkomponenten der zweiten Extraktion (Abb. 4.3.29)

ERGEBNISSE

zeigen keine nennenswerten Änderungen, wobei die Änderung von Rosmarinsäure mit 6% Abnahme am größten ist. Es ist hier kein eindeutiger Einfluss der Bestrahlung erkennbar.

SALBEI, getrocknetes Frischgewürz

In den Chromatogrammen der Extrakte des gefriergetrockneten, frischen Salbeis (Abb. 4.3.30) liegen die Änderungen der Peakflächen nach der Bestrahlung unter 15%. Man kann von einer generellen *leichten* Abnahme (4 von 5 Peaks) sprechen, wobei das Apigenin-Derivat (Peak 5) mit 13% die höchste relative Abnahme zeigt.

ROSMARIN, getrocknetes Frischgewürz

Auch bei den Peakflächen der Rosmarin-Extrakte (Abb. 4.3.31) ist praktisch keine Abnahme zu sehen. Die meisten Peakflächen (7 von 8) nehmen nach der Bestrahlung leicht zu, wobei jene von Peak 4, einem Luteolinderivat, die größte relative Zunahme aufweist (21%).

4.3.5 Zusammenfassung der HPLC-DAD Untersuchungen

Was bereits die unterschiedlichen FC-Werte für die Trockengewürze und die getrockneten Frischgewürze vermuten ließen, wurde durch die qualitative HPLC Analyse bestätigt. Die Zusammensetzung der in 80%igem Methanol löslichen, detektierbaren Substanzen bzw. deren Derivaten unterschied sich erheblich. Wie aus der Literatur bekannt ist, unterscheiden sich Gewürze verschiedener geographischer Herkunft sehr in ihren Inhaltsstoffen – in Kapitel 4.3.1 wurden einige Arbeiten zu den gefundenen Stoffen aufgelistet. Als gemeinsames Ergebnis bleibt jedoch, dass kein eindeutiger Hinweis auf einen Bestrahlungseinfluss gegeben ist (eine Ausnahme bildet die Oregano-Frischgewürzprobe, was bereits diskutiert wurde).

Im Unterschied zu den Totalphenol- und TEAC-Ergebnissen, die mit Sicherheit einen Bestrahlungseinfluss ausschließen ließen, zeigen die qualitativen und quantitativen HPLC Analysen große Unterschiede. In verschiedenen Extrakten wurden verschiedene Inhaltsstoffe bzw. deren Derivate oder auch nicht identifizierbare Substanzen gefunden, die Analyse der Peakflächen zeigte Schwankungen bis zu 25%. Das kann als Hinweis auf den großen Einfluss der Probenaufarbeitung gewertet werden, der offensichtlich größer ist, als der Einfluss der Bestrahlung. Um den Einfluss der Probenaufarbeitung genauer zu erfassen, müssten eine Vielzahl gleicher Gewürzproben untersucht werden, was im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht möglich war.

4.4 Untersuchungen an unbestrahlten und bestrahlten Gewürzen mittels LC-MS

Mittels HPLC-DAD konnte nur eine geringe Anzahl von Verbindungen in den Gewürzextrakten identifiziert werden – der Großteil der Peaks in den Chromatogrammen stammt von unbekannten Verbindungen bzw. von Derivaten bekannter Substanzen. Da diese Verbindungen in beachtlicher Menge in den Extrakten vorhanden waren, und demzufolge am ehesten bei ihnen ein messbarer Bestrahlungseffekt zu erwarten war, wurden an den Extrakten der Trockengewürze Untersuchungen mittels LC-ESI-Q-rTOF-Massenspektrometrie durchgeführt.

Die Gründe für die LC-MS Untersuchungen liegen nicht nur in der Identifikation *unbekannter* Verbindungen, sondern viel mehr in der höheren Selektivität der Messmethode. Dabei ist es auch nicht mehr nötig, auf die vollständige Trennung der Peaks zu achten, was eine Fehlerquelle in den vorangegangenen HPLC-Untersuchungen war. Außerdem können in der Literatur zitierte Gewürzinhaltsstoffe gezielt gesucht und identifiziert werden.

4.4.1 LC-MS Untersuchung eines Standardgemisches und massenspektrometrische Charakterisierung der Vergleichssubstanzen

Die LC-MS Untersuchungen wurden unter denselben chromatographischen Bedingungen wie die beiden HPLC-DAD Messungen durchgeführt. Die verwendete Methode war LC2, die Einstellungen für die ESI-Kopplung sind im experimentellen Teil (Kapitel 3.3.4) angeführt. Es wurde im negativen Modus aufgenommen, d.h. $[M-H]^-$ Ionen wurden detektiert. Die methanolischen Gewürzextrakte wurden vor der Injektion 1 : 1 mit 2,5%iger Ameisensäure verdünnt. Vor und nach den Messungen wurde eine Mischung aus 12 Standardsubstanzen injiziert (Tab. 4.4.1), um deren Retentionszeiten zu überprüfen, sowie um Massenspektren für den Vergleich mit den Gewürzinhaltsstoffen aufzunehmen. Es wurden die gleichen Standardsubstanzen (5×10^{-5} mol/l) verwendet, wie für die HPLC-DAD Untersuchungen. Ihre Molekulargewichte sind in Tabelle 4.4.1 zusammengefasst. Die Verbindungen Carvacrol und Thymol konnten unter den gewählten experimentellen Bedingungen (siehe Kapitel 3.3.4) nicht

ERGEBNISSE

detektiert werden. Dies wurde auch schon von einer anderen Arbeitsgruppe festgestellt (Exarchou et al., 2003).

Verbindung	Abkürzung	Molekulargewicht [g/mol]
Gallussäure	GS	170,2
Catechin	CAT	290,0
Vanillinsäure	VS	168,1
Kaffeesäure	KS	180,2
p-Cumarsäure	p-CS	164,2
Rosmarinsäure	ROS	360,3
Naringenin	NAR	272,3
Luteolin	LUT	286,2
Kämpferol	KÄM	286,2
Apigenin	API	270,2
Carvacrol	CAR	150,2
Thymol	THY	150,2

Tabelle 4.4.1 : Molekulargewichte der Standardsubstanzen

4.4.2 Identifizierung von Inhaltsstoffen und von deren Derivaten

Die graphischen Darstellungen der Chromatogramme aus dem Totalionenstrom der einzelnen chromatographischen Läufe eigneten sich nicht für eine Identifikation oder mengenmäßige Abschätzung einzelner Inhaltsstoffe, daher wurde gezielt nach einzelnen Massen gesucht. Bei den vorausgegangenen HPLC-DAD Experimenten, wurden aus den jeweiligen Chromatogrammen bei 280 nm Peaks nach *bestimmten Kriterien* (Größe, gute Trennung, bekannte Verbindung, Spektrum ähnlich dem einer bekannten Verbindung) ausgewählt und zum Vergleich die Peakflächen der bestrahlten und der unbestrahlten Probe ermittelt. Bei den LC-MS Untersuchungen können jedoch über den ganzen chromatographischen Lauf Massen von Verbindungen ermittelt werden, wodurch auch mögliche Derivate und unbekannte Verbindungen identifiziert werden konnten.

ERGEBNISSE

Dazu wurden sowohl die $[M-H]^-$ Ionen der Standardverbindungen, sowie auch jene von in der Literatur zitierten Gewürzinhaltsstoffen (siehe Tabellen 4.3.1, 4.3.2 und 4.3.3, Kapitel 4.3.1) durch Herausrechnen der Ionenspur (*product-ion-scan*) aus dem gemessenen Totalionenstrom gesucht. Da aus der Literatur bekannt war, dass in MS/MS Untersuchungen von Flavonoiden ein Neutralverlust von m/z 162 bzw. 176 einem Glucosid bzw. einem Glucuronid entspricht (Parejo et al., 2004), konnte gezielt nach diesen Verbindungen gesucht werden. Im Besonderen nach solchen von Luteolin und Apigenin, deren Absorptionen bereits im HPLC-DAD Chromatogramm deutlich zu erkennen waren.

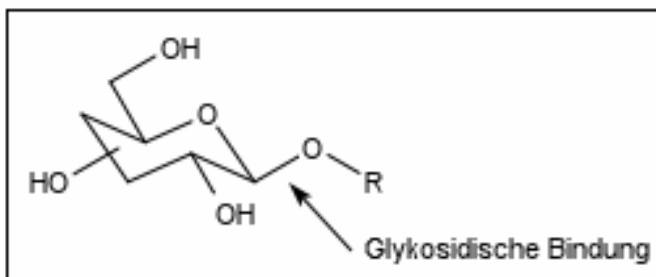


Abb. 4.4.1 : Glucosid eines phenolischen Pflanzeninhaltsstoffes R

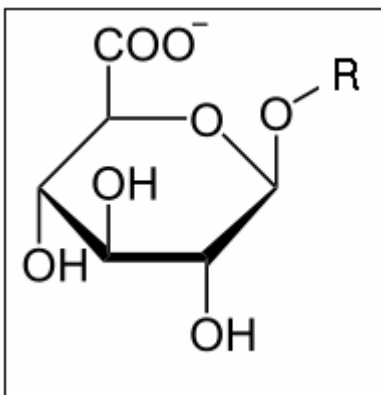


Abb. 4.4.2 : Glucuronid eines phenolischen Pflanzeninhaltsstoffes R

Als Glucoside bezeichnet man organischen Substanzen, bei denen ein Alkohol ($R-OH$) über eine glykosidische Bindung an Glucose gebunden ist (Abb. 4.4.1). Es handelt sich dabei um eine Untergruppe der Glykoside. Bei Glucuroniden ist ein Glucuronsäurerest an das *Aglykon* gebunden (Abb. 4.4.2).

Diese Derivate werden in den folgenden Abbildungen und Tabellen als –gos (Glucosid) bzw. –gur (Glucuronid) bezeichnet.

ERGEBNISSE

OREGANO

Im Extrakt des trockenen Oreganos wurden außer der bereits in den HPLC Untersuchungen mit optischer Detektion identifizierten Rosmarinsäure die Verbindungen Apigenin, Naringenin, Luteolin, Eriodictyol, Hispidulin und Chinasäure gefunden. Weiters konnten mehrere unbekannte Derivate anhand ihrer Massenspektren zugeordnet werden: Eine aus den HPLC-DAD Messungen unbekannte Verbindung des Luteolins wurde als Glucuronid identifiziert, die bisher als VS/PCS-Der bezeichnete Substanz ist *eindeutig* ein Glucosid der Protocatechusäure (PCS-gos), und von Apigenin wurden noch dessen Glucosid bzw. Glucuronid identifiziert, ebenso wie ein Glucuronid des Hispidulins (Tab.4.4.2). Carvacrol konnte unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen, analog wie in der Standardlösung, nicht detektiert werden. Die Fragmente mit den MS-Spektren von Luteolinglucuronid, Apigeninglucuronid, Naringenin und Rosmarinsäure waren identisch mit jenen von Parejo et al., 2003.

Substanz	Abkürzung	t _{ret} [min]	[M-H] ⁻
Chinasäure	CHS	7,3	191
Apigenin	API	143,9	269
Naringenin	NAR	108,6	271
Luteolin	LUT	126,8	285
Eriodictyol	ERI	69,5	287
Hispidulin	HIS	130,8	299
Rosmarinsäure	ROS	90,4	359
Protocatechusäureglucosid	PCS-gos	58,6	421
Apigeninglucosid	API-gos	91,8	431
Apigeninglucuronid	API-gur	93,1	445
Luteolinglucuronid	LUT-gur	86,0	461
Hispidulinglucuronid	HIS-gur	99,0	475

Tabelle 4.4.2 : Identifizierte Inhaltsstoffe im Oregano-Extrakt

In Abbildung 4.4.3 ist das Ionenchromatogramm für die Masse 269, sowie die Massenspektren der Inhaltsstoffe Apigenin (MW: 270 g/mol), Apigeninglucuronid (MW: 446 g/mol) und Apigeninglucosid (MW: 432 g/mol) dargestellt.

ERGEBNISSE

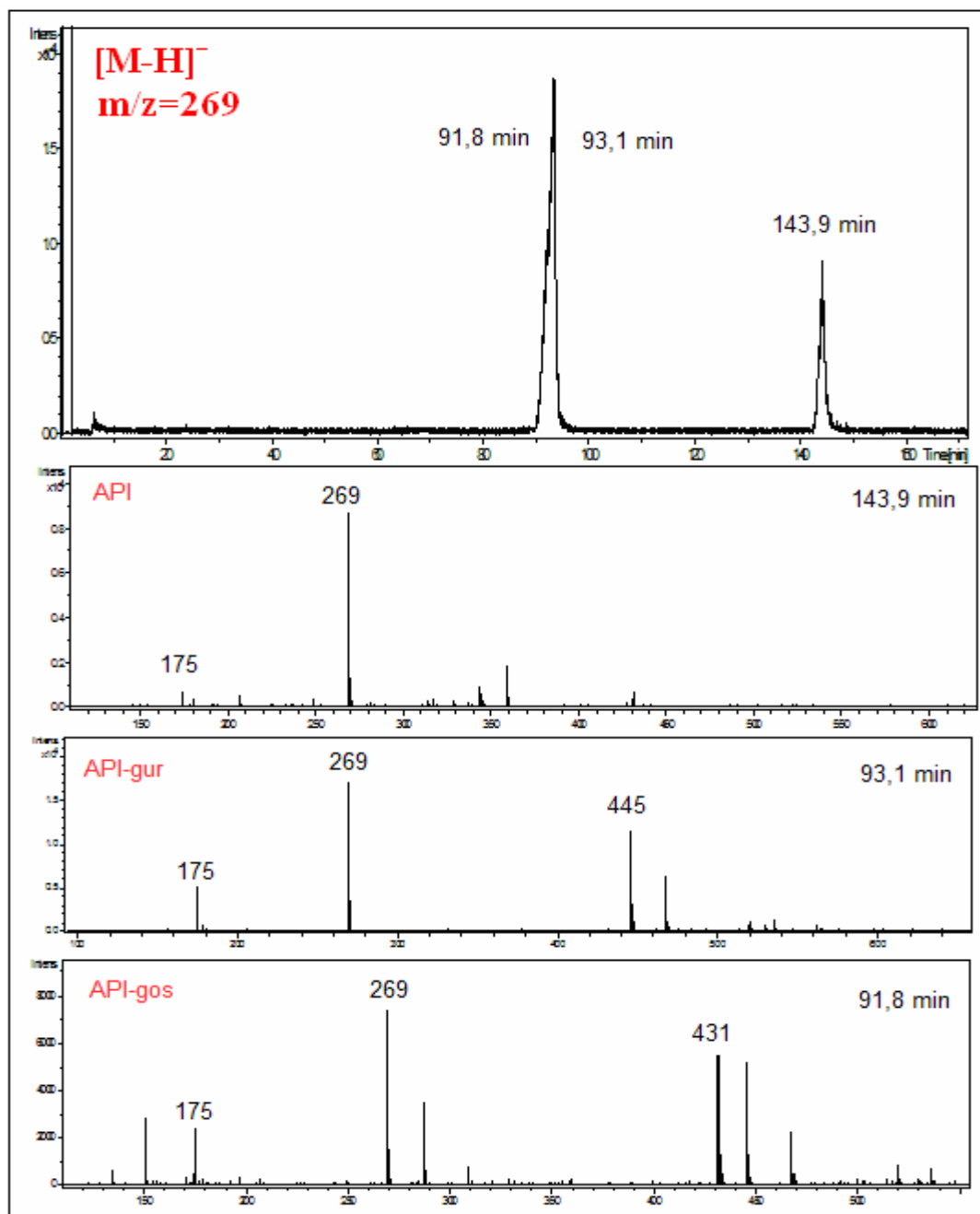


Abb. 4.4.3: Ionenchromatogramm der Masse 269 des Oregano-Extraktes (oben) und Massenspektren von APIGENIN (API) bei 143,9 min, APIGENIN-Glucuronid (API-gur) bei 93,1 min und APIGENIN-Glucosid (API-gos) bei 91,8 min. Glucosid und Glucuronid sind in diesem Ionenchromatogramm nicht als getrennte Peaks sichtbar.

Deutlich ist zu erkennen, dass das Apigenin bei 144 min eluiert, wohingegen die beiden Derivate ob ihrer vergleichsweise höheren Hydrophilie fast gleichzeitig, jedoch früher, bei höherem wässrigen Laufmittelanteil eluieren. In den Massenspektren ist auch die typische Massendifferenz von 162 für das Apigeninglucosid bzw. 176 für das

ERGEBNISSE

Glucuronid zwischen den beiden intensivsten Signalen zu erkennen. Auch beim Protocatechusäurederivat (Abb. 4.4.4) sieht man die Massendifferenz von 162 (421-259) im Massenspektrum (Abb. 4.4.5). Das Fragment 153 entspricht der Masse der Protocatechusäure. Dieses Derivat (4-(3,4-Dihydroxybenzoyloxymethyl)phenyl- β -D-glucopyranosid) wurde zum ersten Mal 1987 von Nakatani & Kikuzaki in Oregano gefunden. Es entspricht der Verbindung, die bei den HPLC-DAD Untersuchungen als VS/PCS-Der bezeichnet wurde (Abb. 4.3.10, 4.3.11 und Tab. 4.3.5).

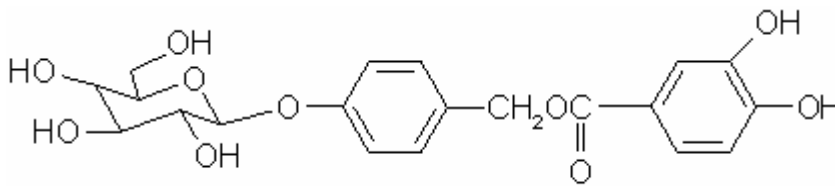


Abb. 4.4.4: Strukturformel des Protocatechusäurederivats (Nakatani & Kikuzaki, 1987)

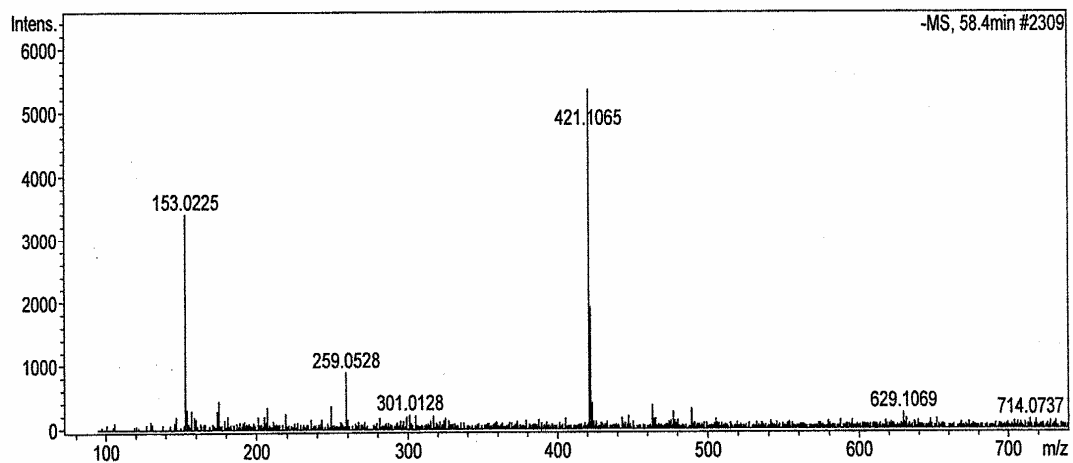


Abb. 4.4.5: Massenspektrum des Glucosids eines Protocatechusäurederivates (PCS-gos) aus dem Massenchromatogramm der Masse $[M-H]^-$ 421 des Oregano-Extraktes

THYMIAN

Bei den LC-MS Untersuchungen des Thymian Extraktes konnten in signifikanter Menge die Glucoside bzw. Glucuronide von Rosmarinsäure, Kaffeesäure, Apigenin, Eriodictyol und Luteolin gefunden werden. Als Aglykone wurden Rosmarinsäure, Chinasäure und die *Salbeisäuren* I und K, gebräuchlicher ist die englische Bezeichnung *Salvianolic acid* (SAC-I bzw. SAC-K), gefunden (Tab. 4.4.3). Salvianolic acid I, ein Kaffeesäure-Derivat der Rosmarinsäure (3'-O-(8''-Z-caffeoyl)rosmarinic-acid), wurde das erste Mal 2002 in Thymian von Dapkevicius et al. nachgewiesen. In dieser Literatur

ERGEBNISSE

wird auch Luteolin-7-glucuronid als Inhaltsstoff erwähnt. Salvianolic acid K ist bisher nur in Salbei nachgewiesen worden.

Substanz	Abkürzung	t _{ret} [min]	[M-H] ⁻
Chinasäure	CHS	7	191
Kaffeesäureglucosid	KS-gos	52,1	341
Rosmarinsäure	ROS	115,4	359
Apigeninglucuronid	API-gur	120,4	445
Eriodictyolglucosid	ERI-gos	61,2	449
Luteolinglucuronid	LUT-gur	99,1	461
Eriodictyolglucuronid	ERI-gur	66,4	463
Rosmarinsäureglucosid	ROS-gos	93,1	521
Salvianolic acid I	SAC-I	123,7	537
Salvianolic acid K	SAC-K	117,6	555,1

Tabelle 4.4.3 : Identifizierte Inhaltsstoffe im Thymian-Extrakt

Abbildung 4.4.6 zeigt das Ionenchromatogramm (m/z 191) sowie das Massenspektrum der Chinasäure. Es soll darauf hingewiesen werden, dass diese Verbindung bis jetzt nicht in den Gewürzen Oregano, Thymian und Salbei gefunden wurde. In Abbildung 4.4.7 ist das Ionenchromatogramm und das Massenspektrum des Luteolinglucuronids mit Neutralverlust 176 zwischen dem Molekülpeak [M-H]⁻ 461 und der Masse des Aglykons Luteolin, [M-H]⁻ 285 abgebildet. Des Weiteren wird in Abbildung 4.4.8 das Massenspektrum des Eriodictyol-glucuronids (Molekülpeak: [M-H]⁻ 463, Aglykon Eriodictyol [M-H]⁻ 287) gezeigt.

ERGEBNISSE

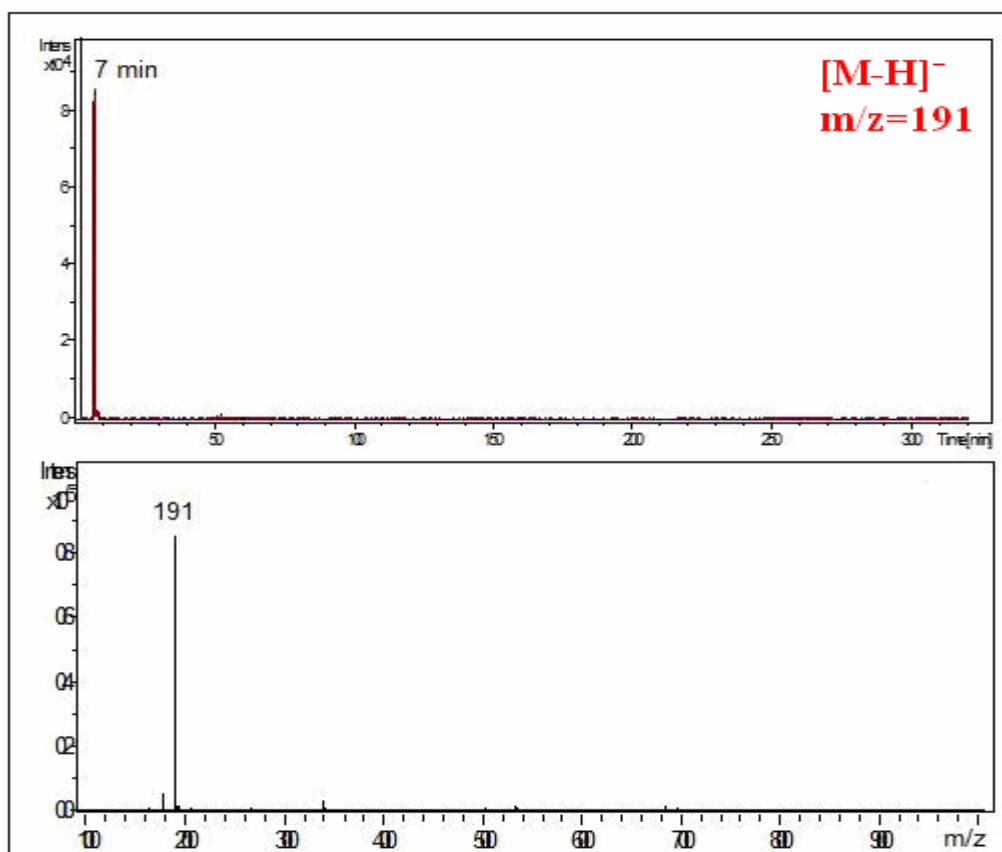


Abb. 4.4.6 : Ionenchromatogramm der Masse 191 (oben) und Massenspektrum am Peakmaximum bei 7 min (unten) aus dem Chromatogramm des Thymian-Extraktes. Identifiziert als: CHINASÄURE (CHS)

ERGEBNISSE

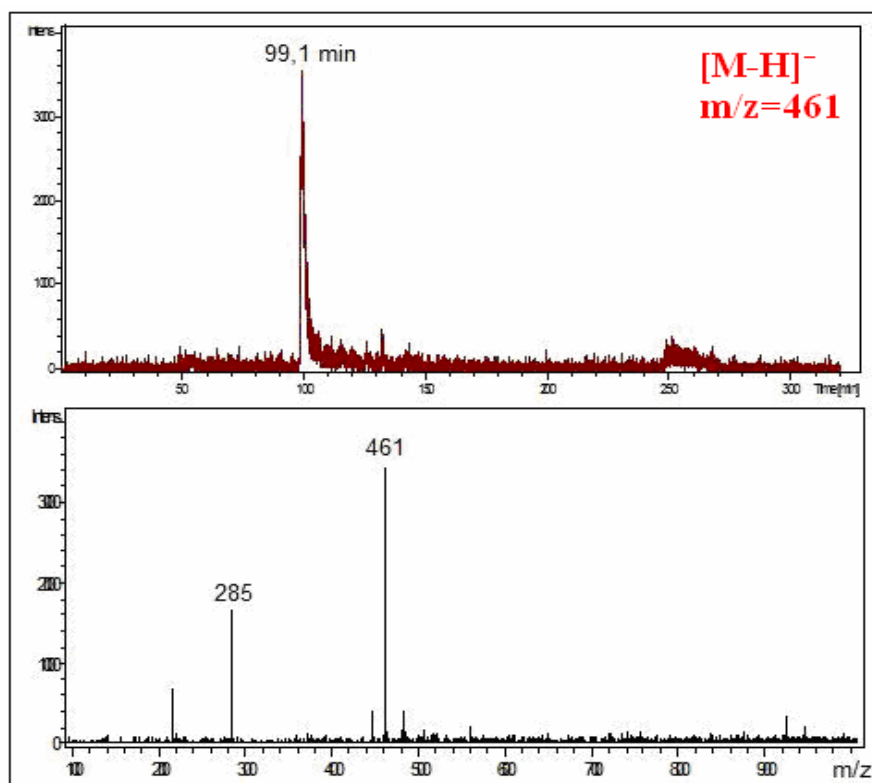


Abb. 4.4.7 : Ionenchromatogramm der Masse 461 (oben) und Massenspektrum am Peakmaximum bei 99,1 min (unten) aus dem Chromatogramm des Thymian-Extraktes. Identifiziert als: LUTEOLIN-Glucuronid (LUT-gur)

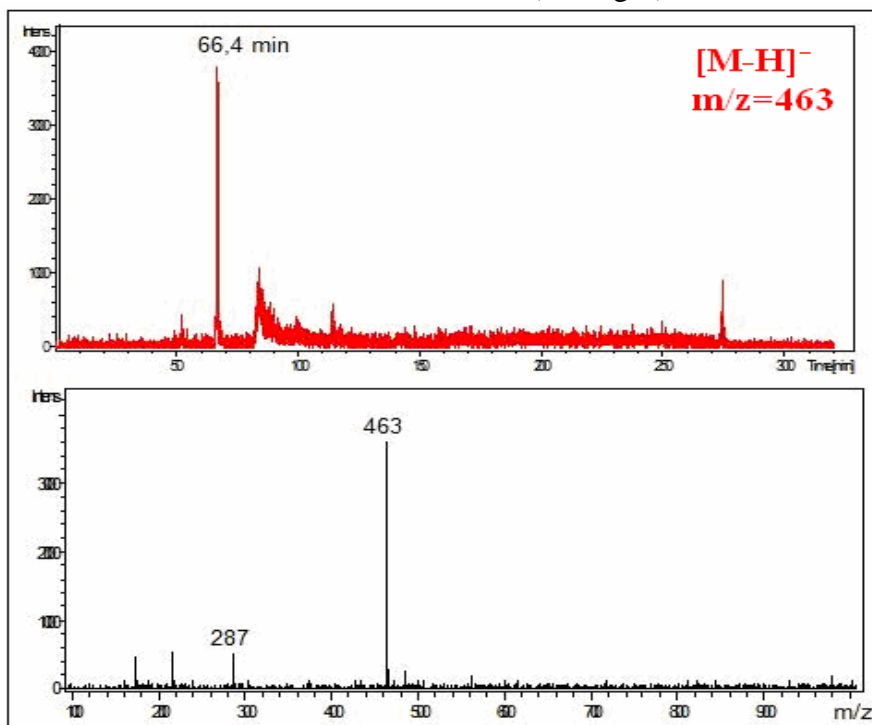


Abb. 4.4.8 : Ionenchromatogramm der Masse 463 (oben) und Massenspektrum am Peakmaximum bei 66,4 min (unten) aus dem Chromatogramm des Thymian-Extraktes. Identifiziert als: ERIODICTYOL-Glucuronid (ERI-gur)

ERGEBNISSE

Wird ein Ionenchromatogramm bei der Masse m/z 359, diese entspricht dem $[M-H]^-$ der Rosmarinsäure, aufgenommen, so werden an vier Positionen im Chromatogramm Signale detektiert. Wird bei den entsprechenden Retentionszeiten über einen Massenbereich von 100-1000 m/z gescannt, so können neben Rosmarinsäure als Aglykon drei weitere Verbindungen (siehe Abb. 4.4.9) identifiziert werden.

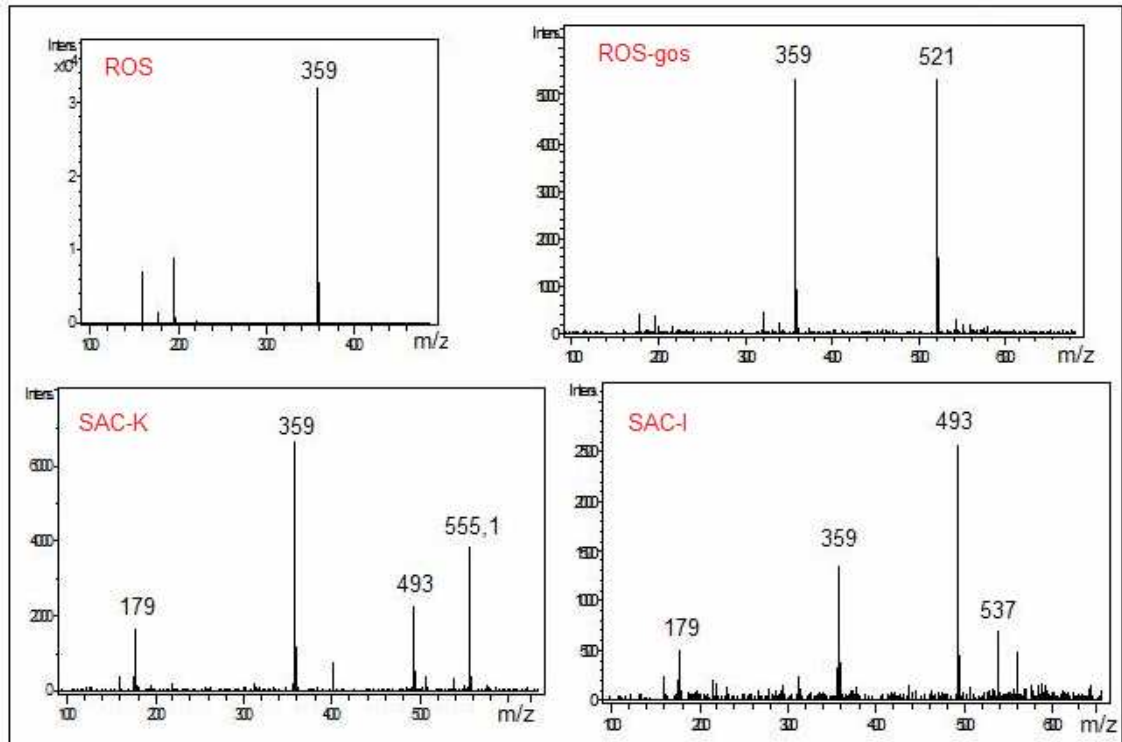


Abb. 4.4.9 : Massenspektren aus dem Ionenchromatogramm der Masse 359 des Thymian-Extraktes: Identifizierte Substanzen: ROSMARINSÄURE (ROS), ROSMARINSÄURE-Glucosid (ROS-gos), SALVIANOLIC ACID K (SAC-K) und SALVIANOLIC ACID I (SAC-I).

SALBEI

Bei den LC-MS Untersuchungen des Salbei-Extraktes konnten die Glucoside bzw. Glucuronide von Luteolin, Apigenin und Hispidulin, sowie die Aglykone Chinasäure, Rosmarinsäure und die Salbeisäure *Salvianolic acid K* gefunden werden (Tab. 4.4.4).

ERGEBNISSE

Substanz	Abkürzung	t _{ret} [min]	[M-H] ⁻
Chinasäure	CHS	8	191
Rosmadial	RDL	156,9	343
Rosmanol	ROL	142,8	345
Rosmarinsäure	ROS	115	359
Apigeninglucosid	API-gos	120,7	431
Apigeninglucuronid	API-gur	119,7	445
Luteolinglucosid	LUT-gos	101,2	447
Luteolinglucuronid	LUT-gur	97,6	461
Hispidulinglucuronid	HIS-gur	124,2	475
Salvianolic acid K	SAC-K	117,2	555

Tabelle 4.4.4 : Identifizierte Inhaltsstoffe im Salbei-Extrakt

Außerdem wurden noch zwei weitere Verbindungen anhand ihrer charakteristischen Massenbruchstücke in mehreren Peaks (also vermutlich auch als nicht näher bekannte Derivate) identifiziert: Rosmadial (Abb. 4.4.10) und Rosmanol (Abb. 4.4.12). Ihre Strukturformeln sind in Abb. 4.4.11 dargestellt.

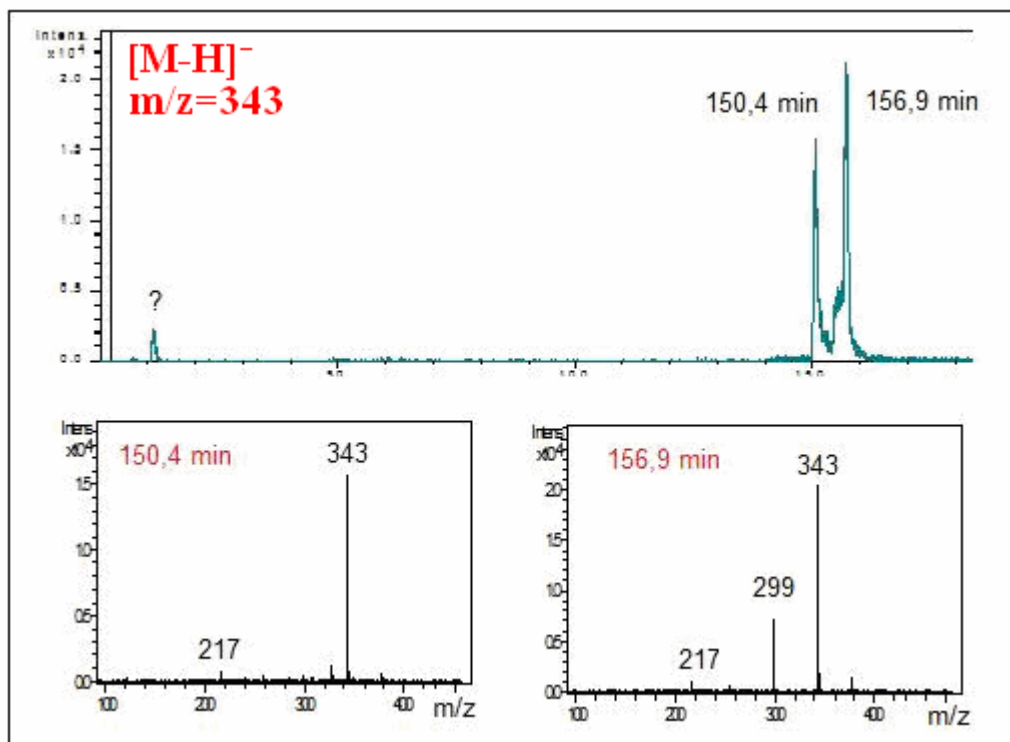


Abb. 4.4.10 : Ionenchromatogramm der Masse 343 des Salbei-Extraktes und Massenspektren der Peakmaxima bei 150,4 min und 156,9 min.

ERGEBNISSE

Beide Massenspektren weisen auf die Gegenwart von Rosmadiol hin. Der kleine Peak bei 11,1 min zeigt keine auswertbaren Fragmentmassen.

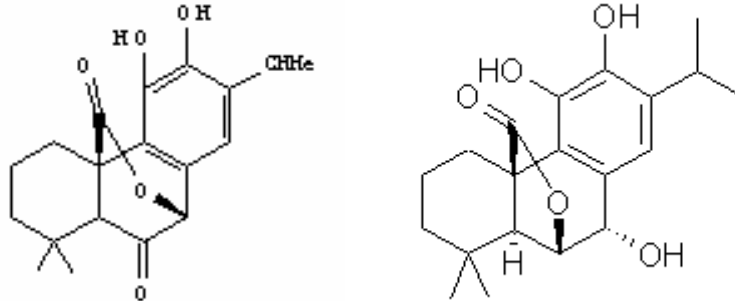


Abb. 4.4.11 : Strukturformel von ROSMADIAL (links) und ROSMANOL (rechts)

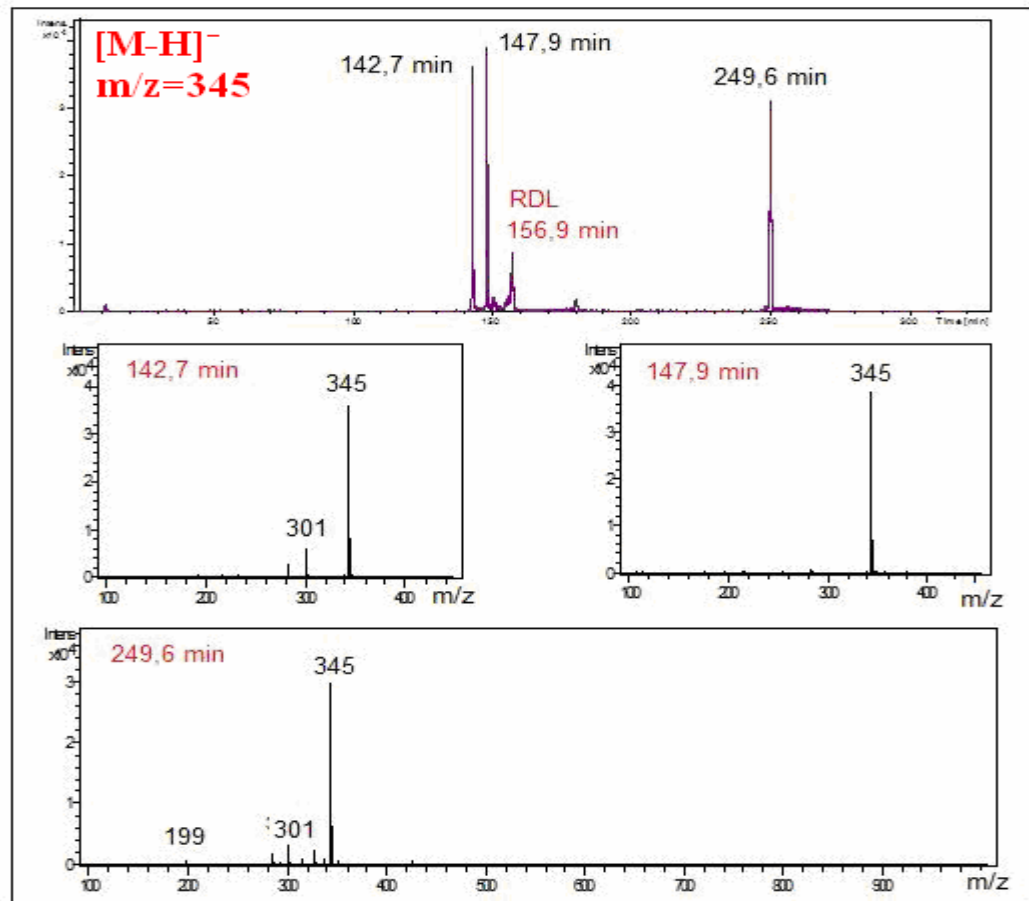


Abb. 4.4.12 : Ionenchromatogramm der Masse 345 des Salbei-Extraktes (oben) und Massenspektren der Peakmaxima bei 142,7 min 147,9 min (Mitte) und 249,6 min (unten). Die Massenspektren weisen auf Isomere von Rosmanol hin. Der kleine Peak bei 156,9 min zeigt das schon besprochene ROSMADIAL-Spektrum.

ERGEBNISSE

Es soll erwähnt werden, dass die Masse m/z 301, sichtbar in zwei der gezeigten Rosmanol-Massenspektren, bereits von Señorans et al., 2000, als Fragment bei MS-Messungen von Rosmanol gefunden wurde.

4.4.3 Mengenmäßige Abschätzung identifizierter Inhaltsstoffe

OREGANO

Die Abschätzung der relativen Änderungen der Peakflächen der gefundenen Inhaltsstoffe wurde in den $[M-H]^-$ -Ionenchromatogrammen der einzelnen Substanzen vorgenommen. Die Peakflächen sind im Balkendiagramm, Abb. 4.4.13, dargestellt.

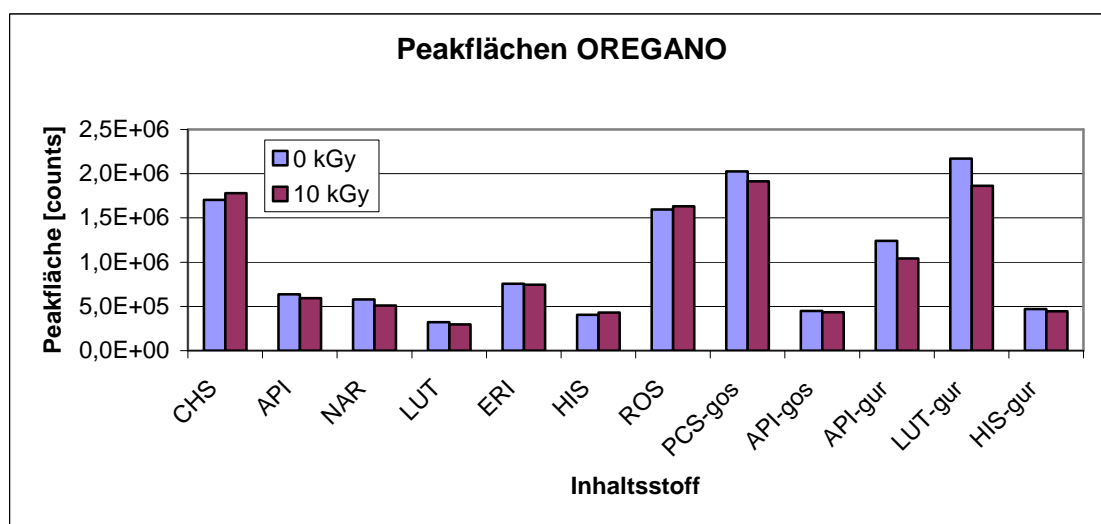


Abb. 4.4.13 : Graphische Darstellung der relativen Menge der Inhaltsstoffe im Oregano

Die Mehrheit der Peakflächen (9 von 12) zeigt eine geringe Abnahme, wobei die Änderungen generell um $\pm 5\%$ liegen. Ausnahmen bilden die Peakflächen der Glucuronide des Apigenins (-16%) sowie des Luteolins (-14%).

THYMIAN

Die Peakflächen der identifizierten Substanzen sind graphisch im Balkendiagramm, Abb. 4.4.14, dargestellt.

ERGEBNISSE

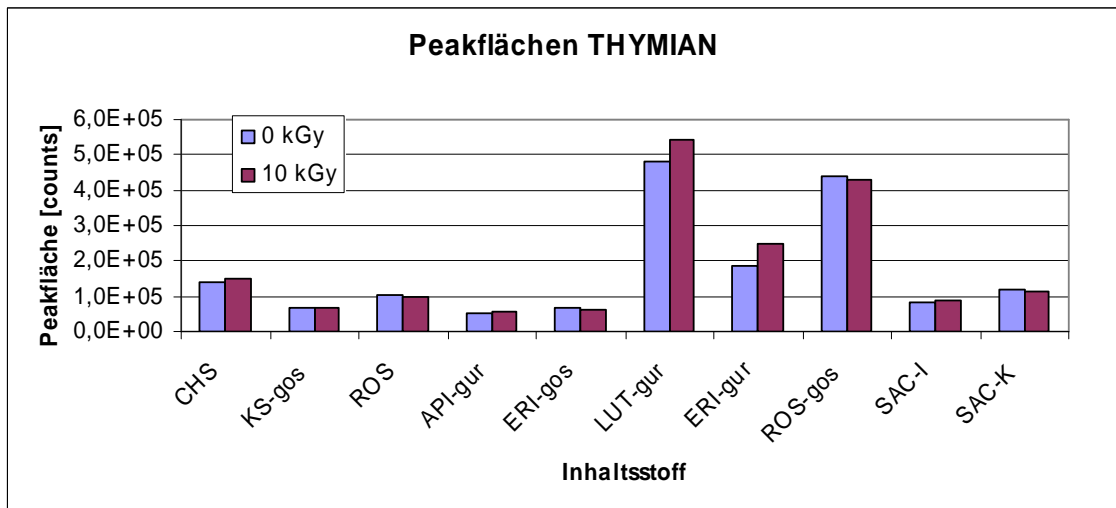


Abbildung 4.4.14 : Graphische Darstellung der relativen Menge der Inhaltsstoffe im Thymian. Anmerkung: Aus Gründen der Anschaulichkeit sind die Balken für CHINASÄURE (CHS) und ROSMARINSÄURE (ROS) auf ein Zehntel ihrer wirklichen Größe verkleinert dargestellt.

Auch in den Ionenchromatogrammen des Thymian-Extraktes ändern sich die Peakflächen generell um +/- 5%. Die drei Ausnahmen sind hier die Glucuronide von Luteolin (+13%) und Eriodictyol (+35%) sowie Salvianolic acid I (+12%).

SALBEI

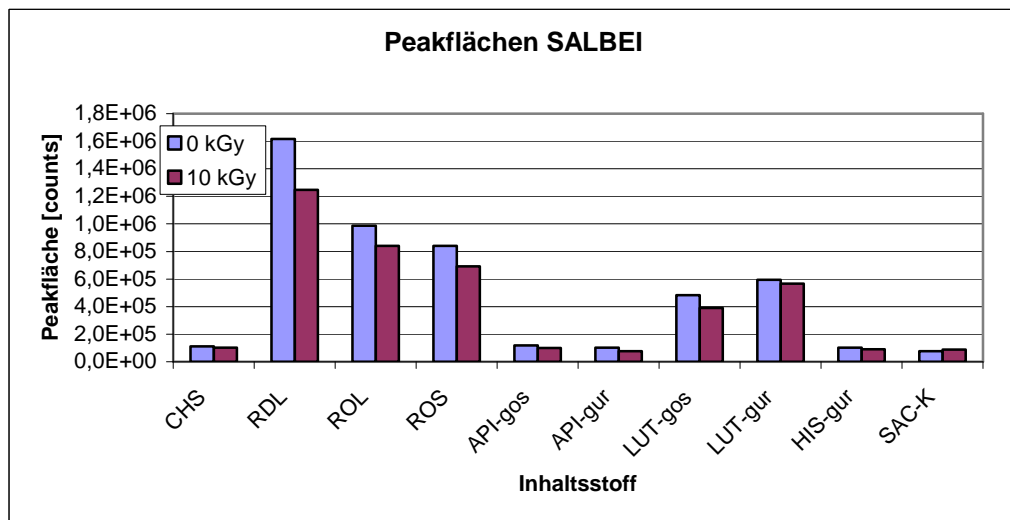


Abb. 4.4.15 : Graphische Darstellung der relativen Menge der Inhaltsstoffe im Salbei

In den Ionenchromatogrammen der Salbei-Extrakte ist eine generelle Abnahme aller Peaks (bis auf Salvianolic acid K) zu beobachten. Die größte relative Abweichung

ERGEBNISSE

zeigen hier Rosmadial (-23%) und das Apigeninglucuronid (-25%), wobei letztes nur in geringer Menge nachgewiesen werden konnte, was die große Abnahme wieder relativiert.

4.4.4 Vergleich der HPLC-DAD und LC-MS Untersuchungen

Um die Ergebnisse für unbestrahlte und bestrahlte Gewürzproben, erhalten mit beiden Messmethoden, HPLC-DAD und LC-MS, einander gegenüberstellen zu können, wurden nur diejenigen Substanzen herangezogen, die durch beide Methoden zugeordnet bzw. identifiziert werden konnten.

OREGANO

In Tabelle 4.4.5 sind die Substanzen, ausgewählt für Oregano, und die prozentuellen Änderungen ihrer Peakflächen angegeben. Deutlich ist, dass die aus dem *gleichen* Extrakt (Extrakt 2) erhaltenen prozentuellen Änderungen bei HPLC-DAD und LC-MS eine Abnahme (vergleichbare Werte) zeigen, Rosmarinsäure zeigt bei beiden Methoden eine geringfügige Zunahme.

Inhaltsstoff ↓ / Analysenmethode →	LC2/Extrakt 1 DAD	LC1a/Extrakt 2 DAD	LC2/Extrakt 2 MS
Luteolin-Glucuronid	+4,7	-21	-14,1
Apigenin-Derivat(e) Glucuronid Glucosid	+8,5	-15	-16,1
			-3,4
Rosmarinsäure	+15,3	+4	+2,2
Protocatechusäure-Glucosid	+5,1	-4	-5,6

Tabelle 4.4.5: Prozentuelle Änderung der Peakflächen in den Chromatogrammen des Oregano-Extraktes nach Bestrahlung, aufgenommen mit den Methoden LC2, LC1a, bei 280 nm, sowie LC2-MS bei der jeweiligen Masse $[M-H]^-$ der Substanzen

ERGEBNISSE

THYMIAN

Die HPLC-DAD und LC-MS Ergebnisse zeigten bei Thymian für beide, Extrakt 1 und Extrakt 2, bei den KS/ROS-Derivaten und den LUT-Derivaten eine zunehmende Tendenz der Peakflächen nach der Bestrahlung. Eine Ausnahme stellt das Rosmarinsäureglucosid in der LC-MS Messung dar. Bei Rosmarinsäure ergaben nur die gleichen Extrakte eine Übereinstimmung, eine Abnahme zwischen 7% (MS) und 15% (DAD) (Tabelle 4.4.6).

Inhaltsstoff ↓ / Analysenmethode →	LC2/Extrakt 1 DAD	LC1a/Extrakt 2 DAD	LC2/Extrakt 2 MS
KS/ROS-Der (KS-gos) (ROS-gos)	+2,7	+16	+0,5
			-1,5
LUT-Der (Glucuronid)	+16,4	+24	+13,3
Rosmarinsäure	+5,5	-15	-7,1

Tabelle 4.4.6: Prozentuelle Änderung der Peakflächen in den Chromatogrammen des Thymian-Extraktes nach Bestrahlung, aufgenommen mit den Methoden LC2, LC1a bei 280 nm und mit LC 2-MS bei den entsprechenden Massen $[M-H]^-$ der Substanzen

SALBEI

Ähnlich wie bei Oregano sind auch bei Salbei die Unterschiede der Peakflächen in den verschiedenen Extrakten größer als die der gleichen Extrakte (Tab. 4.4.7). Auffallend sind bei diesem Gewürz die deutlichen Konzentrationsabnahmen nach Bestrahlung, erhalten bei den LC-MS Messungen.

Inhaltsstoff ↓ / Analysenmethode →	LC2/Extrakt 1 DAD	LC1a/Extrakt 2 DAD	LC2/Extrakt 2 MS
Luteolin-Der. (Glucosid) (Glucuronid)	+7,6	+4	-19,4
			-4,6
Apigenin-Der. (Glucosid) (Glucuronid)	-	-11	-14,5
			-24,9
Rosmarinsäure	+15,5	-7	-17,7

Tabelle 4.4.7: Prozentuelle Änderung der Peakflächen in den Chromatogrammen des Salbei-Extraktes nach Bestrahlung, aufgenommen mit den Methoden LC2, LC1a bei 280 nm und mit LC 2-MS bei den entsprechenden Massen $[M-H]^-$ der Substanzen

ERGEBNISSE

Résumé

Die Abschätzung eines Bestrahlungseinflusses war bei den relativ großen prozentuellen Schwankungen der Analysenergebnisse verschiedener Extraktionen nicht möglich. Generell kann gesagt werden, dass es, bis auf das leicht restfeuchte Frischgewürz Oregano, bei *keiner* der untersuchten trockenen bzw. gefriergetrockneten frischen Gewürzproben zu einer *eindeutigen signifikanten Abnahme* der phenolischen Hauptkomponenten durch die Bestrahlung gekommen ist. Eine repräsentative Auswahl an Verbindungen zeigt sowohl in der optischen, als auch in der massenspektrometrischen Detektion experimentell verursachte Schwankungen.

Sicherlich sind die LC-MS Untersuchungen bezüglich einer Zu- bzw. Abnahme der relativen Menge eines bestimmten Inhaltsstoffs vertrauenswürdiger und aussagekräftiger, da hier selektiv *eine* Massenspur untersucht wurde – im Gegensatz zu teilweise ungenügend getrennten Peaks in den HPLC-DAD Messungen. Die Ergebnisse für die gleichen Extrakte zeigen aber meist denselben Trend.

ZUSAMMENFASSUNG

5 CONCLUSIO

Die durchgeführten Analysen an den Gewürzextrakten von Oregano, Thymian, Salbei und Rosmarin belegen, dass eine Strahlenbehandlung mit der maximal erlaubten Gesamtdosis von 10 kGy *keinen* signifikanten Einfluss auf den Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen hat. Vorstellbar ist ein geringfügiger Abbau der Inhaltsstoffe, was durch die Messergebnisse der nicht vollständig getrockneten Probe des frischen Oreganos untermauert wird, doch dürfte dieser Abbau in den trockenen Gewürzen so gering sein, dass er aufgrund der nicht reproduzierbaren Extraktion nicht messbar war. Eine quantitative Bestimmung des Bestrahlungseffektes wäre nur dann möglich, wenn man die Extraktion z.B. durch Anwendung einer Soxhlet-Extraktion ersetzt und die natürlichen Schwankungen der Inhaltsstoffe in den Gewürzen durch große Mengen an homogenisierter Probe ausgleicht.

LITERATUR

6 LITERATUR

Beyer, H.; Walter, W.; 1981. Lehrbuch der organischen Chemie. 19. Auflage, *S. Hirzel Verlag, Stuttgart*, p. 40-41.

Bundesgesetzblatt für die Republik Österreich. Verordnung: Behandlung von Lebensmitteln und Verzehrsprodukten mit ionisierenden Strahlen. 6.10.2000, Nr. 327.

Bray, H. G.; Thorpe, W.V., 1954. Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism. *Meth. Biochem. Anal.* 1, 27-52.

Budzikiewicz, H., 1998. Massenspektrometrie, eine Einführung, Vierte Auflage, *WILEY-VCH, Weinheim*, p. 9-44.

Calucci, L.; Pinzino, C.; Zandomenoghi, M.; Capocchi, A.; Ghiringhelli, S.; Saviozzi, F.; Tozzi, S.; Galleschi, L., 2003, Effects of gamma-irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 927-934.

Codex Stan. 106-1983. General Standard For Irradiated Foods. *Rev.1-2003, FAO/WHO Joint Publications*. www.codexalimentarius.net

Dapkevicius, A.; Van Beek, T. A.; Lelyveld, G. P.; Van Veldhuizen, A.; De Groot, Ae.; Linssen, J.P.H.; Venskutonis, R., 2002. Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* Leaves. *J. Nat. Prod.*, 65, 892-896.

Demtröder, W., 2000. Experimentalphysik 3. Atome, Moleküle und Festkörper. *Springer-Verlag, Berlin*, p. 153-156.

Delincée, H., 2002. Analytical methods to identify irradiated food- a review. *Radiat. Phys.Chem.*, 63, 455-458.

LITERATUR

- Diehl, J.F., 2002. Food irradiation – past, present and future. *Radiat. Phys. Chem.*, 63, 211-215.
- Ehlermann, D.A.E.; Delincée, H., 1999. Die Strahlenkonservierung von Lebensmitteln (Irradiation preservation of foods). *Bundesforschungsanstalt für Ernährung (BFE), Karlsruhe*. digib.ubka.uni-karlsruhe.de/volltexte/1281999
- Exarchou, V.; Godejohann, M.; Van Beek, T. A.; Gerozhanassis, I. P.; Vervoort, J., 2003. LC-UV-Solid-Phase Extraction NMR-MS Combined with a Cryogenic Flow Probe and its Application to the Identification of Compounds present in Greek Oregano. *Anal. Chem.*, 75, 6288-6294.
- Fujie, A.; Yoshida, K.; Kazuko, K., 2003. Antioxidative phenolic acids from oregano (*Origanum vulgare* L.) leaves. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 50(9), 405-410.
- Gerothanassis, I. P.; Exarchou, V.; Lagouri, V.; Troganis, A.; Tsimidou, M.; Boskou D., 1998. Methodology for Identification of Phenolic Acids in Complex Phenolic Mixtures by High-Resolution Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance. Application to Methanolic Extracts of Two Oregano Species. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4185-4192.
- Giulivi, C.; Cadenas, E., 1993. Inhibition of Protein Radical Reactions of Ferrylmyoglobin by the Water-Soluble Analog of Vitamin E, Trolox C. *Arch. Biochem. Biophys.*, 303 (1), 152–158.
- Guillen, M. D.; Manzanos M. J., 1998. Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. plant. *Food Chem.*, 63 (3), 373-383.

LITERATUR

- Haire, L. D.; Chen, G.; Janzen, E. G.; Fraser, L.; Lynch, J. A., 1997. Identification of irradiated foodstuffs: a review of the recent literature. *Food Res. Int.*, 30 (3/4), 249-264.
- Heiss, R.; Eichner, K., 2002. Haltbarmachen von Lebensmitteln. Chemische, physikalische und mikrobiologische Grundlagen der Qualitätssicherung. *Springer-Verlag, Berlin*, p. 283-299.
- Henglein, A., Schnabel, W., Wendenburg, J., 1969, Einführung in die Strahlenchemie. *Verlag Chemie GmbH, Weinheim / Bergstr.* 131-169, 263-279.
- Justesen, U.; Knuthsen, P., 2001. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chem.*, 73, 245-250.
- Kikuzaki, H.; Nakatani, N., 1989. Structure of a New Antioxidative Phenolic Acid from Oregano. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 519-524.
- Kitazuru, E. R.; Moreira, A. V. B.; Manicini-Filho, J.; Delincee, H.; Villavicencio, A. L. C. H., 2004. Effects of irradiation on natural antioxidants of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* N.). *Radiat. Phys. Chem.*, 71, 37-39.
- Koseki, P. M.; Villavicencio, A. L. C. H.; Brito, M.S.; Nahme, L.C.; Sebastiao, K.I.; Rela, P.R.; Almeida-Muradian, L.B.; Mancini-Filho, J.; Freitas, P.C.D., 2002, Effects of irradiation in medicinal and edible herbs, *Radiat. Phys. Chem*, 63, 681-684.
- Lee, S. J.; Umamo, K.; Shibamoto, T.; Lee K. G., 2005. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem.*, 91, 131-137.

LITERATUR

Max Rubner-Institut (Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel),
Karlsruhe, BRD. www.mri.bund.de

Lu, Y.; Foo, L. Y., 2001. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.*, 75, 197-202.

Matsingou, T. C.; Petrakis, N.; Kapsokefalou, M.; Salifoglu, A., 2003. Antioxidant activity of organic extracts from aqueous infusions of sage. *J.Agric. Food Chem.*, 51, 6696-6701.

Mikkelsen, R. B.; Wardman, P., 2003. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*, 22, 5734–5754.

Miller, N. J.; Rice-Evans, C., 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*, 84 (4), 407-412.

Miura, K.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N., 2002. Antioxidant Activity of Chemical Components from Sage (*Salvia officinalis* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Measured by the Oil Stability Index Method. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1485-1851.

Murcia, M. A.; Egea, I.; Romojaro, F.; Parras, P.; Jimenez A. M.; Martinez-Tome, M., 2004. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of Irradiation Procedure. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1872-1881.

Murrell, J. N., 1967. Elektronenspektren Organischer Moleküle. *Bibliographisches Institut, Mannheim*, p. 40-41.

LITERATUR

- Ostling, O; Johanson, K. J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123: 291-298.
- Otto, M., 1995. Analytische Chemie. *Wiley-VCH*, 2.Auflage, Weinheim, 260-280, 413-430.
- Parejo, I.; Jauregui, O.; Sánchez-Rabaneda, F.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Codina, C. 2004. Separation and Characterization of Phenolic Compounds in Fennel (*Foeniculum vulgare*) Using Liquid Chromatography-Negative Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem*, 52. 3679-3687.
- Peterson, G. L., 1979. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* 100, 201-220.
- Proestos, C.; Chorianopoulos, N.; Nychas, G. J.; Komaitis, M., 2005. RP-HPLC Analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidative capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1190-1195.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C., 1998. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Rad. Biol. & Med.*, 26, 1231-1237.
- Richtlinie 1999/2/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über mit ionisierenden Strahlen behandelte Lebensmittel und Lebensmittelbestandteile. *Official Journal of the European Union L 66*.
- Richtlinie 1999/3/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über die Festlegung einer Liste von mit ionisierenden Strahlen behandelten Lebensmitteln und Lebensmittelbestandteilen. *Official Journal of the European Union L 66*.

LITERATUR

- Satin, M., 1996. Food Irradiation, A Guidebook, *Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, Pennsylvania, USA*.
- Schwarz, K.; Ernst, H.; Ternes, W., 1996. Evaluation of antioxidative constituents from thyme, *J. Sci. Food Agric.*, 70, 217-223.
- Señoráns, F. J.; Ibañez, E.; Cavero, S.; Tabera, J.; Reglero, G., 2000. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants. *J. Chromatogr. A*, 870, 491-499.
- Shan, B.; Cai, Y. Z.; Sun, M.; Corke, H., 2005. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of their Phenolic Constituents. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 7749-7759.
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Jr., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.*, 144-158.
- Soobrattee, M. A.; Neergheen, V.S.; Luximon-Ramma, A.; Aruoma, O. I.; Bahorun, T., 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mut. Res.*, 579, 200-213.
- Spinks, J.W.T., Woods, R.J., 1990, An Introduction to Radiation Chemistry, Third Edition, *John Wiley & Sons, Inc., New York*, p. 14-67.
- Suhaj, M.; Racova, J.; Polovka, M.; Brezova, V., 2006, Effect of gamma-irradiation on antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.), *Food Chem.*, 97, 696-704.
- Tsimogannis, D.; Stavrakaki, M.; Oreopoulou, V., 2006. Isolation and characterisation of antioxidant components from oregano (*Origanum heracleoticum*). *Int. J. Food Sci. Technol.*, 41 (Supplement 1), 39-48.

LITERATUR

- Ulmann, R.M., 1972. Introducing irradiated foods to the producer and consumer. *Peaceful uses of atomic energy, Vienna, IAEA*, 12, 299-308.
- Universität Karlsruhe. Institut für Verfahrenstechnik. Lebensmittelbestrahlung.
<http://www.bfa-ernaehrung.de/bestrahlung/Code/Deutsch/06Nachweisverfahren.htm>
- Woods, R. J.; Pikaev, A. K., 1994. Applied Radiation Chemistry. *John Wiley & Sons, Inc., New York*, pp. 30.
- Yanishlieva, N. V.; Marinova, E.; Pokorny, J., 2006. Natural antioxidants from herbs and spices. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 108, 776-793.
- Zheng, W.; Wang, Sh. Y., 2001. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5165-5170.

7 ANHANG

I Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.1 : Entstehung von Phenoxylradikalen aus phenolischen Antioxidantien.

Abb. 2.1.1 : Radiolyse des Wassers

Abb. 2.1.2 : Zusammenhang zwischen Dosis und Absorbance im bestrahlten NaCl-Kristall

Abb. 2.2.1 : ^{60}Co -Bestrahlungsanlage (Spinks, J.W.T., Woods, R.J., 1990)

Abb. 2.2.2 : Elektronen-Bestrahlungsanlage (Spinks, J.W.T., Woods, R.J., 1990)

Abb. 2.2.3 : Radura – Symbol zur Kennzeichnung bestrahlter Lebensmittel

Abb. 2.2.4 : In der EU zur Bestrahlung zugelassene Lebensmittel

Abb. 2.3.1 : Zweistrahl-Spektralphotometer

Abb. 2.4.1 : Van Deemter Diagramm und die drei beitragenden Terme

Abb. 2.4.2 : DAD mit Durchflusszelle

Abb. 2.5.1 : Quadrupol Massenfilter

Abb. 2.5.2 : TOF-Analysator

Abb. 2.5.3 : Reflektor-TOF

Abb. 2.5.4 : ESI

Abb. 3.3.1 : ^{60}Co -Strahlenquelle Gammacell 220

Abb. 3.3.2 : Laufmittelprofile Methode LC 1

Abb. 3.3.3 : Laufmittelprofile Methode LC 2

Abb. 3.3.4 : Laufmittelprofile Methode LC 1a

Abb. 3.5.1 : Trolox Molekülstruktur

Abb. 3.5.2 : ABTS Molekülstruktur

Abb. 4.1.1 : Mittelwert dreier Eichgeraden der Gallussäure für die Phenolbestimmung

Abb. 4.2.1 : Extinktion verschiedener Verdünnungen der ABTS^{•+}-Standardlösung

Abb. 4.2.2 : TROLOX-Eichgerade für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität

Abb. 4.2.3 : Graphische Darstellung der TEAC vs. Totalphenol-Messwerte der Trockengewürzextrakte.

Abb. 4.3.1 : Strukturformeln der vier in allen Gewürzen gefundenen Inhaltsstoffe.

Abb. 4.3.2 : Trennung von Standardsubstanzen mit Methode LC1, λ 280 nm

ANHANG

Abb. 4.3.3 : Eichgeraden und Kalibrierfunktionen

Abb. 4.3.4 : Trennung von 3 Standardsubstanzen mit Methode LC2, λ 280 nm

Abb. 4.3.5 : Trennung von 6 Standardsubstanzen mit der Methode LC 2, λ 280 nm

Abb. 4.3.6 : UV-Spektren von Naringenin, Apigenin und Luteolin

Abb. 4.3.7 : UV-Spektren der beiden Isomere Thymol und Carvacrol

Abb. 4.3.8 : UV-Spektren von Rosmarinsäure und Kaffeesäure

Abb. 4.3.9 : UV-Spektren des Protocatechualdehyds und der entsprechenden Säure

Abb. 4.3.10 : Chromatogramm eines Oregano Extraktes (Methode LC 2)

Abb. 4.3.11 : Chromatogramm eines Oregano Extraktes (Methode LC 1a)

Abb. 4.3.12 : Chromatogramm eines Oregano Extraktes (Methode LC 1, Frischgewürz)

Abb. 4.3.13 : Chromatogramm eines Thymian Extraktes (Methode LC 2)

Abb. 4.3.14 : Chromatogramm eines Thymian Extraktes (Methode LC 1a)

Abb. 4.3.15 : Chromatogramm eines Thymian Extraktes (Methode LC 1, Frischgewürz)

Abb. 4.3.16 : Chromatogramm eines Salbei Extraktes (Methode LC 2)

Abb. 4.3.17 : Chromatogramm eines Salbei Extraktes (Methode LC 1a)

Abb. 4.3.18 : Chromatogramm eines Salbei Extraktes (Methode LC 1, Frischgewürz)

Abb. 4.3.19 : Chromatogramm eines Rosmarin Extraktes (Methode LC1, Frischgewürz)

Abb. 4.3.20 : Vergleich der Spektren des Apigenins (rot) und der Substanz Nummer 6
im Chromatogramm des Rosmarin-Extraktes

Abb. 4.3.21 : Integration unvollständig getrennter Peaks (HPLC-DAD, 280 nm)

Abb. 4.3.22 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Oregano-
Extrakt (Methode LC 2)

Abb. 4.3.23 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Oregano-
Extrakt (Methode LC 1a)

Abb. 4.3.24 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Oregano-
Extrakt (Methode LC 1, Frischgewürz)

Abb. 4.3.25 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Thymian-
Extrakt (Methode LC 2)

Abb. 4.3.26 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Thymian-
Extrakt (Methode LC 1a)

Abb. 4.3.27 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Thymian-
Extrakt (Methode LC 1, Frischgewürz)

ANHANG

- Abb. 4.3.28 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Salbei-Extrakt (Methode LC 2)
- Abb. 4.3.29 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Salbei-Extrakt (Methode LC 1a)
- Abb. 4.3.30 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Salbei-Extrakt (Methode LC 1, Frischgewürze)
- Abb. 4.3.31 : Graphische Darstellung der Peakflächen von Substanzen im Rosmarin-Extrakt (Methode LC 1, Frischgewürz)
- Abb. 4.4.1 : Glucosid eines phenolischen Pflanzeninhaltsstoffes
- Abb. 4.4.2 : Glucuronid eines phenolischen Pflanzeninhaltsstoffes
- Abb. 4.4.3 : Ionenchromatogramm der Masse 269 des Oregano-Extraktes
- Abb. 4.4.4 : Strukturformel des Glucosids der Protocatechusäure
- Abb. 4.4.5 : Massenspektrum des Protocatechusäure-Glucosids (PCS-gos)
- Abb. 4.4.6 : Ionenchromatogramm der Masse 191 des Thymian-Extraktes (CHS)
- Abb. 4.4.7 : Ionenchromatogramm der Masse 461 des Thymian-Extraktes (LUT-gur)
- Abb. 4.4.8 : Ionenchromatogramm der Masse 463 des Thymian-Extraktes (ERI-gur)
- Abb. 4.4.9 : Massenspektren aus dem Ionenchromatogramm der Masse 359 des Thymian-Extraktes (ROS, ROS-gos, SAC-K, SAC-I)
- Abb. 4.4.10 : Ionenchromatogramm der Masse 343 des Salbei-Extraktes (RDL)
- Abb. 4.4.11 : Strukturformel von ROSMADIAL und ROSMANOL
- Abb. 4.4.12 : Ionenchromatogramm der Masse 345 des Salbei-Extraktes (ROL)
- Abb. 4.4.13 : Peakflächen der Inhaltsstoffe im Oregano
- Abb. 4.4.14 : Peakflächen der Inhaltsstoffe im Thymian
- Abb. 4.4.15 : Peakflächen der Inhaltsstoffe im Salbei

ANHANG

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.1 : Reichweite von Elektronen und Elektromagnetischer Strahlung in
Materie

Tabelle 2.1.2 : pH-Abhängigkeit des G-Wertes der Primärprodukte der Wasserradiolyse

Tabelle 3.1.1 : verwendete Chemikalien

Tabelle 3.3.1 : Gradientenzusammensetzungen der verwendeten Analysemethoden

Tabelle 4.1.1 : Gesamtphenolgehalt der Gewürzextrakte, Trockengewürz

Tabelle 4.1.2 : Gesamtphenolgehalt der Gewürzextrakte der Frischgewürze

Tabelle 4.2.1 : TEAC-Werte, Trockengewürz

Tabelle 4.3.1 : Inhaltsstoffe von Oregano und Arbeiten, die ihre Analyse behandeln

Tabelle 4.3.2 : Inhaltsstoffe von Thymian und Arbeiten, die ihre Analyse behandeln

Tabelle 4.3.3 : Inhaltsstoffe von Salbei und Arbeiten, die ihre Analyse behandeln

Tabelle 4.3.4 : Abkürzungen, Retentionszeiten (bei Methode LC1) sowie

Absorptionsmaxima der verwendeten Vergleichssubstanzen

Tabelle 4.3.5: HPLC-Analyse Oregano; Peaknummern, Substanzen und Ret.zeiten.

Tabelle 4.3.6: HPLC-Analyse Thymian: Peaknummern, Substanzen und Ret.zeiten.

Tabelle 4.3.7: HPLC-Analyse Salbei: Peaknummern, Substanzen und Ret.zeiten.

Tabelle 4.3.8: HPLC-Analyse Rosmarin frisch: Peaks, Substanzen und Ret.zeiten.

Tabelle 4.4.1 : Molekulargewichte der Standardsubstanzen

Tabelle 4.4.2 : Identifizierte Substanzen im Oregano-Extrakt

Tabelle 4.4.3 : Identifizierte Substanzen im Thymian-Extrakt

Tabelle 4.4.4 : Identifizierte Substanzen im Salbei-Extrakt

Tabelle 4.4.5 : Prozentuelle Änderung der Peakflächen in den Chromatogrammen des
Oregano-Extraktes

Tabelle 4.4.6 : Prozentuelle Änderung der Peakflächen in den Chromatogrammen des
Thymian-Extraktes

Tabelle 4.4.7 : Prozentuelle Änderung der Peakflächen in den Chromatogrammen des
Salbei-Extraktes

ANHANG

III Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2-Azinobisethylbenzothiazolin-6-sulphonsäure
API	Apigenin (4',5,7-Trihydroxyflavon)
CAR	Carvacrol
CAT	Catechin
DAD	Diodenarraydetektor / Diodenarray-Detektion
-Der	-Derivat
ERI	Eriodictyol (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavanon)
ESR	Elektronenspinresonanz (-Spektroskopie)
GAE	Gallus Acid Equivalents
-gos	-Glucosid
GS	Gallussäure
-gur	-Glucuronid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KÄM	Kämpferol
KS	Kaffeesäure
LUT	Luteolin
MS	Massenspektrometrie
n.i.	nicht identifiziert
NAR	Naringenin (4',5,7-Trihydroxyflavanon)
PCA	Protocatechusäure (3,4-Dihydroxybenzoesäure)
PCS	Protocatechualdehyd (3,4-Dihydroxybenzaldehyd)
p-CS	p-Cumarsäure
ROS	Rosmarinsäure
TEAC	Trolox Equivalent Antiooxidant Capacity
TG	Trockengewicht
THY	Thymol
TL	Thermolumineszenz
TOF	Time Of Flight-Analysator
TROLOX	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure
VS	Vanillinsäure

ANHANG

IV Curriculum Vitae

Tristan Oliver Nagy

Geboren am 5. März 1982 in Villach, Kärnten.

1988-1992: Volksschule in Treffling, Kärnten.

*1992-2000: Bundesgymnasium Porcia, Spittal an der Drau, Kärnten. Reifeprüfung in
Latein, Geschichte, Chemie.*

*2001-2008: Chemiestudium an der Universität Wien, Schwerpunkte: Analytische
Chemie, Theoretische Chemie, Physikalische Chemie.*

März 2007 –Juni 2009

*Diplomarbeit aus Analytischer Chemie
am Institut für Ernährungswissenschaften, Sektion Strahlenbiologie*